

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM



Практикум по ветеринарной микробиологии

В.И.И.

Практикум по ветеринарной микробиологии

*Допущено Главным управлением высшего
и среднего сельскохозяйственного образования
Министерства сельского хозяйства в каче-
стве учебного пособия для ветеринарных вузов
и факультетов*



ББК 48
П69
УДК 619:576.8(075.8),

Практикум по ветеринарной микробиологии
П 69 В. А. Байрак, В. М. Беляев, С. С. Гительсон
и др. — М.: Колос. 1980. — 216 с., ил. — (Учебники
и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений).

Пособие состоит из двух частей: лабораторно-практические занятия по общей микробиологии и лабораторно-практические занятия по частной микробиологии. Даны основные принципы изучаемых методик исследования, техника их освоения и практическое назначение. В книгу включены методы бактериологических, микологических и серологических диагностических исследований, а также микробиологической (санитарной) оценки воды, воздуха, почвы и кормов.

П 40903-161 196-80. 3805020000
035(01)-80

ББК 48
636.09

*Василий Афанасьевич Байрак, Василий
Михайлович Беляев, Сара Самуиловна Гительсон,
Тамара Стефановна Костенко, Евгения Игоревна Скаршевская*

ПРАКТИКУМ ПО ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Редактор Н. И. Емельянова
Художественный редактор З. П. Зубрилина
Технические редакторы З. П. Околелова, В. А. Зорина
Корректор С. В. Вишнякова

ИБ № 1823

Сдано в набор 10.12.79. Подписано к печати 28.05.80. Т-11301.
Формат 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 11,34. Уч.-изд. л. 11,65. Изд. № 183. Тираж 25 000 экз.
Заказ № 504. Цена 40 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Колос», 107807, ГСП,
Москва, Б-53, ул. Садовая-Спасская, 18.

Набрано в ордена Октябрьской Революции и ордена Трудового Красного
Знамени Первой Образцовой типографии имени А. А. Жданова Союзполи-
графпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, поли-
графии и книжной торговли. Москва, М-54, Валовая, 28.

Отпечатано с матриц во Владимирской типографии «Союзполиграфпрома»
при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии
и книжной торговли, 600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7

Предлагаемый «Практикум по ветеринарной микробиологии» составлен коллективом кафедры микробиологии Московской Ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной академии имени К. И. Скрябина. Материал в нем представлен в соответствии с учебной программой, утвержденной Главным управлением высшего и среднего сельскохозяйственного образования Министерства сельского хозяйства СССР.

Со времени выхода последнего подобного издания прошло более 10 лет. За это время ветеринарная микробиология обогатилась новыми фактическими данными. В связи с этим возникла необходимость издания нового практикума.

Цель данного пособия — помочь студентам овладеть основными методами микробиологических исследований, что в конечном итоге будет способствовать усвоению программного материала.

Книга состоит из двух частей: общей и частной микробиологии. В первой части изложены данные по лабораторной технике и общие принципы методов бактериологических и иммунологических исследований, во второй — бактериологические и иммунологические методики применительно к диагностике отдельных инфекционных заболеваний. Материал иллюстрирован рисунками, специальными таблицами, а также схемами последовательности проведения диагностических исследований. Кроме того, описываются правила взятия и пересылки патологического материала для исследования в лаборатории. После каждой темы приводятся контрольные вопросы для самопроверки студентов по пройденному материалу.

В конце книги в качестве приложения помещен краткий перечень основных диагностических и профилактических биопрепаратов.

Отдельные разделы руководства написаны следующими авторами.

В. А. Байраком: 1) питательные среды, методы культивирования, культуральные свойства бактерий; термостат; 2) антибиотики; бактериофаг; 3) бактериологическая диагностика стафилококковых и стрептококковых заболеваний; 4) бактериологическая и серологическая диагностика сибирской язвы.

В. М. Беляевым: 1) методы бактериологического исследования количественного и качественного содержания микроорганизмов в воздухе, воде, почве, кормах (санитарная бактериологическая оценка); 2) морфология актиномицетов, плесневых и дрожжевых грибов, методы обнаружения их в кормах; 3) лептоспиры; 4) микологические диагностические исследования при отдельных заболеваниях (дерматомикозах, фузариотоксикозе и др.).

С. С. Гительсон: 1) микроскоп (устройство и правила работы с ним), принцип электронной микроскопии; 2) краски, их растворы, техника приготовления препаратов; методы окраски, микроскопирование окрашенных препаратов; исследование бактерий в живом состоянии; морфология бактерий; 3) серологические реакции — преципитации, флуккуляции, Кумбса, гемагглютинации, РСК; 4) семейство кишечных; 5) бактериологическое исследование анаэробов; 6) микоплазмы (ОПП, ОТПП); 7) вибрионы; 8) риккетсии.

Т. С. Костенко: 1) техника и принцип люминесцентной и фазово-контрастной микроскопии; 2) методы стерилизации; 3) лабораторные животные; методы их заражения и бактериологического исследования; 4) методы флуоресцирующих антител; 5) возбудитель рожи свиней; 6) возбудитель пастереллез; 7) возбудитель листериоза; 8) возбудители туляремии, сапа, мелиоидоза.

Е. И. Скаршевской: 1) ветеринарная бактериологическая лаборатория, правила работы в ней, техника безопасности; 2) биохимические свойства бактерий; 3) опсоно-фагоцитарная реакция; реакция агглютинации; 4) бактериологическая и серологическая диагностика бруцеллеза; 5) возбудители туберкулеза и паратуберкулеза.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ (ВЕТЕРИНАРНАЯ) ЛАБОРАТОРИЯ И ЕЕ ЗАДАЧИ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ

Ветеринарные лаборатории — это учреждения государственной ветеринарной службы, деятельность которых направлена на обеспечение благополучия в животноводстве, предупреждение и ликвидацию болезней и падежа животных, а также на охрану населения от болезней, общих для животных и человека. По своему назначению ветеринарные лаборатории бывают районные, межрайонные (зональные), областные (краевые) и республиканские.

Основная задача ветеринарных лабораторий — установление точного диагноза болезней сельскохозяйственных животных (включая птиц), пушных зверей, рыб и пчел, а также проведение экспертизы мяса, молока и других пищевых продуктов и кормов. В лабораториях можно выполнять научные работы, осуществлять производство некоторых биостимуляторов, антибиотиков и др.

Материалом для лабораторных исследований служат кровь, моча, мокрота, молоко, фекалии, содержимое абсцессов (гной), полученные при жизни; кусочки паренхиматозных органов или других тканей после смерти животных, а также пробы объектов внешней среды (воды, воздуха, почвы, кормов, растений, смывов с предметов ухода). Материал в лаборатории исследуют бактериологическими, серологическими, гистологическими, биохимическими методами, для чего должны быть созданы необходимые условия (специально отведенные помещения, оборудование, микроклимат и др.).

Лабораторию размещают в отдельном здании, вдали от проезжих дорог. В лаборатории предусматривают приемное отделение, патологоанатомический, бактериологический, серологический, биохимический, вирусологический отделы; выделяют специальные помещения для термостатов, для стерилизационного оборудования и для мытья посуды. В комнате для мытья посуды должны быть столы, раковины, горячая и холодная вода, газовая или электрическая плита, стеллажи для вымытой посуды, вытяжной шкаф, эмалиро-

ванные ванны, тазы и другие емкости, раствор кислоты в стеклянных сосудах для обеззараживания пипеток, предметных стекол и другой посуды. Отдельное помещение отводят для *бактериологической кухни* (средоварочной), где готовят питательные среды для культивирования микроорганизмов, монтируют посуду для стерилизации. Здесь же в шкафах хранят стерильную посуду и хорошо упакованные химические вещества, компоненты питательных сред.

Для выполнения работы в асептических условиях оборудуют специальные изолированные помещения — *боксы*.

Лабораторных животных (белых мышей, морских свинок, белых крыс, кроликов и др.) размещают в *виварии*. Как правило, в виварии содержат также здоровых баранов-доноров, кровь которых используют для реакции связывания комплемента (РСК) и приготовления питательных сред.

Кроме того, выделяют комнаты для специалистов, обслуживающего персонала, кабинета заведующего, библиотеки, весовой, раздевалки, склада и т. п.

Во всех ветеринарных лабораториях имеется бактериологический отдел, которым заведует ветеринарный врач, а в учебных учреждениях (ветеринарных, медицинских, биологических, агрономических и др.) — микробиологические учебные лаборатории, где студенты овладевают методами микробиологических исследований. Комнаты отдела должны быть светлыми, просторными, хорошо вентилируемыми, с окнами, открывающимися наружу и обращенными на север. Если же окна расположены на южную сторону, то в солнечные дни их необходимо закрывать шторами.

Чтобы поддерживать надлежащую чистоту, пол в комнатах покрывают линолеумом или каменной плиткой. Стены и потолки, как правило, гладкие (без карнизов и лепных украшений), с закругленными углами, окрашенные в светлые тона масляной краской. Потолки можно белить известью. Желательно стены облицевать пластиком или плиткой на $\frac{2}{3}$ высоты от пола.

В лаборатории должны быть краны с горячей и холодной водой, канализация, педальное ведро для мусора, которое ежедневно освобождают, моют и дезинфицируют, полотенце, мыло, дезинфицирующий раствор. В комнатах устанавливают только самое необходимое оборудование: столы, шкаф для хранения мелкой аппаратуры, красок, реактивов, посуды, инструментов и т. п. Столы устойчивые, удобные, высотой 80 см, с закраинкой располагают перед

окнами. Поверхность столов покрывают пластиком или линолеумом, стеклом или белой специальной краской. На столе размещают микроскоп на расстоянии 1 м от окна, а также необходимые предметы для бактериологической работы.

Бактериологический метод исследования, как правило, включает микроскопию, выделение и изучение свойств чистой культуры возбудителя болезни и заражение лабораторных животных (биопробу). Результаты бактериологического анализа за подписью заведующего отделением или директора лаборатории сообщают только официальным лицам: ветеринарному врачу, зооинженеру, руководителю хозяйства.

Правила работы и техника безопасности в ветеринарно-бактериологических лабораториях (отделах). Все сотрудники лабораторий, а также кафедр микробиологии, аспиранты, студенты, приходящие на занятия и работающие в научно-студенческих кружках (НСК), прежде чем приступить к работе с заразным материалом (культурами патогенных микробов, трупами экспериментально зараженных животных, выделениями больных животных, кровью и др.), обязаны ознакомиться со следующими правилами работы и техники безопасности в ветбаклабораториях и строго соблюдать их:

в помещение лаборатории входить можно только в халате и белой шапочке или косынке (халат должен быть наглухо застегнут, волосы подобраны под шапочку);

в лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания. Портфели и сумки складывают в специально выделенном месте;

в помещении лаборатории категорически запрещается курить, принимать пищу;

за каждым работником (студентом) под определенным номером закрепляется рабочее место, микроскоп и другие принадлежности;

на рабочем месте размещают только необходимое оборудование для выполнения конкретной работы. Обычно это набор красок, бутыль с дистиллированной водой, сливная чашка, банки с чистыми и отработанными стеклами, бактериологическая петля, штатив, банка с дезинфицирующим раствором;

перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, газовых горелок (спиртовок) и пр. О замеченных недостатках и неисправностях со-

общают ответственному лицу лаборатории, а на учебных занятиях — преподавателю;

чтобы избежать взрыва, нельзя зажигать одну спиртовку (или газовую горелку) от другой, пользуются только спичками;

нельзя касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети;

студенты без ведома преподавателя или обслуживающего персонала не должны включать электроприборы и аппаратуру;

студенты приступают к работе только с разрешения преподавателя и всю работу проводят в строгом соответствии с изучаемой методикой;

каждый сотрудник и студент должен соблюдать опрятность в работе, содержать в чистоте рабочее место и оборудование;

материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как особо опасный;

при распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность — банки с материалом снаружи обтирают дезинфицирующим раствором и ставят только на подносы или кюветы;

при исследовании поступившего материала и при работе с бактериальными культурами (и вирусами) придерживаются общепринятых в бактериологической практике технических приемов, исключающих возможность инфицирования работника;

изучая отдельных возбудителей инфекционных болезней, студенты должны усвоить особенности правил техники безопасности при работе с конкретными возбудителями;

вскрытие трупов экспериментальных (лабораторных) животных производят в специальной одежде, на оборудованном столе с помощью необходимых инструментов, используя для этих целей кюветку, залитую воском (или парафином). Инструменты после вскрытия помещают в стакан с дезраствором или обжигают над пламенем горелки, на стол класть их запрещается;

при работе с жидким инфицированным материалом используют резиновые баллоны, соединенные с пипеткой;

жидкости, содержащие патогенных микробов, переливают над сосудом с дезраствором;

если в процессе работы патологический материал случайно попал на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании

зараженного материала на кожу, конъюнктиву, в рот принимают экстренные меры к обеззараживанию;

по окончании работы патологический материал, использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают;

в конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю, а рабочее место приводят в порядок. Выносить из лаборатории пробирки с культурами, препараты (мазки) и другие предметы категорически запрещается;

патологический материал и бактериальные культуры, необходимые для дальнейшей работы, оставляют на хранение в закрытом рефрижераторе или сейфе;

перед уходом из лаборатории необходимо снять халат, тщательно вымыть руки и обработать их йодированным спиртом. Выходить за пределы лаборатории в халатах запрещается;

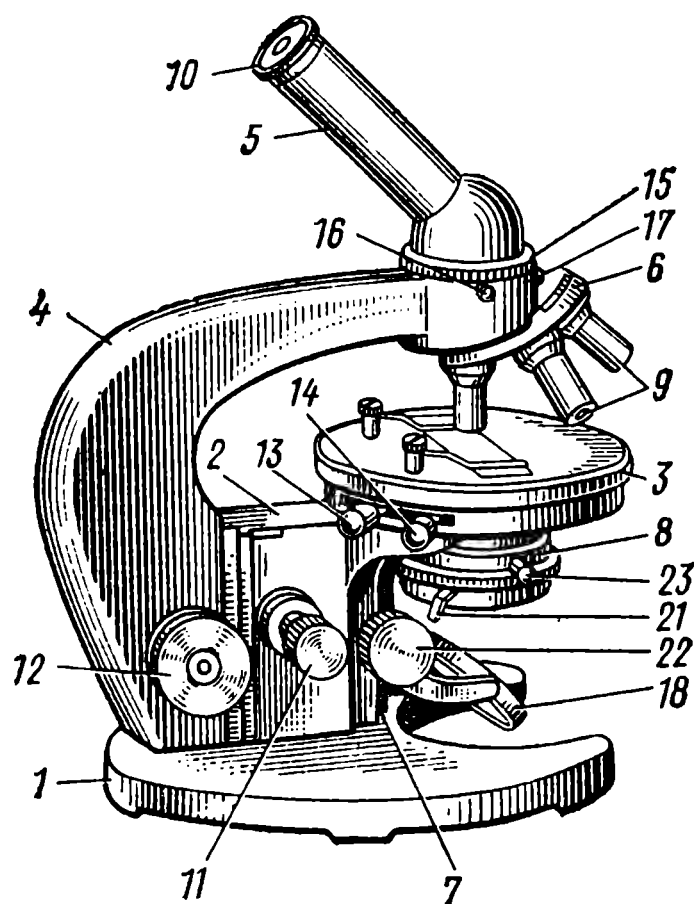
выполнение правил работы и технику безопасности на учебных занятиях по микробиологии контролируют дежурные студенты. С техникой безопасности при работе на кафедре микробиологии студенты знакомятся на первом занятии, о чем расписываются в журнале.

Соблюдая перечисленные правила, исследующий обеспечивает стерильность манипуляций и предупреждает возникновение внутри- и внелабораторного заражения.

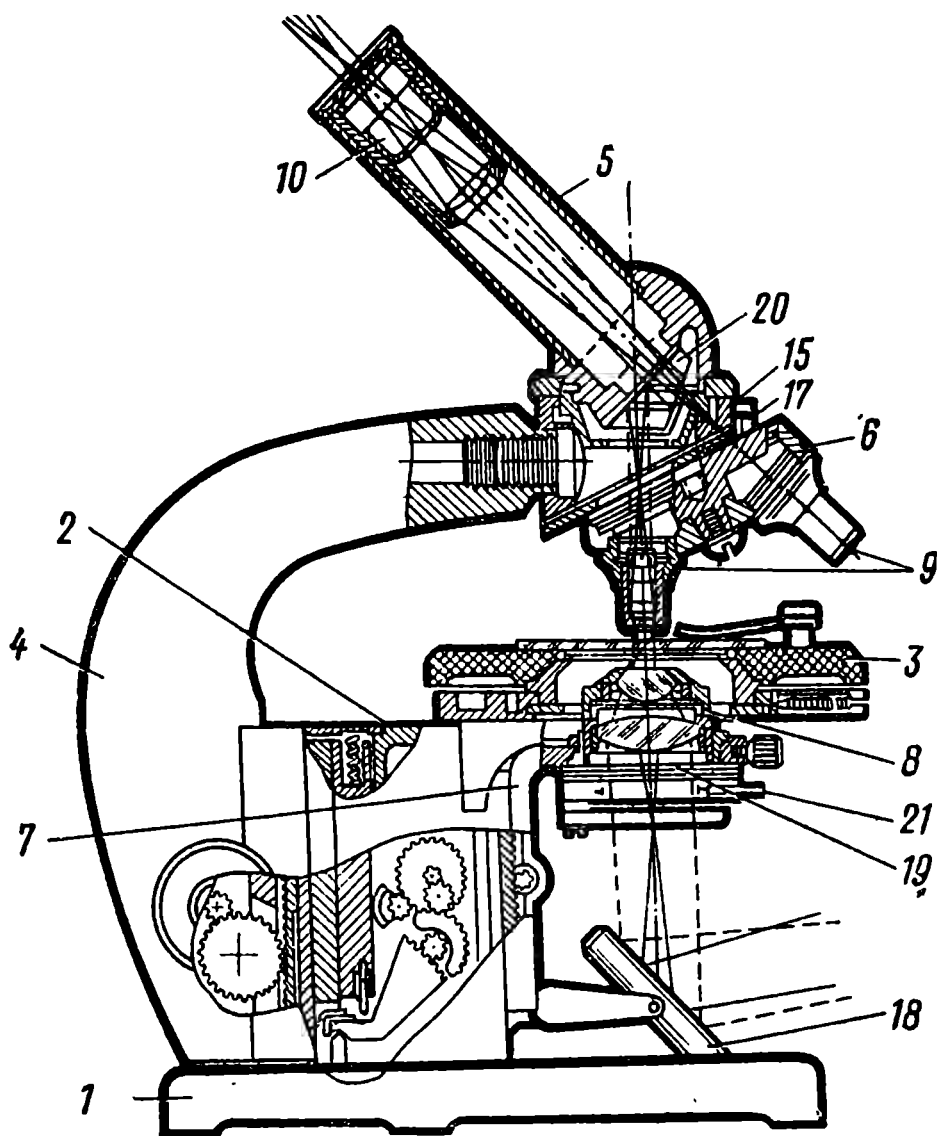
МИКРОСКОПЫ, ИХ УСТРОЙСТВО И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМИ

Чтобы установить вид микроба при диагностике, необходимо определить его морфологию, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные свойства, антигенную структуру, фаготипы. Для изучения морфологии и тинкториальных свойств микроорганизмов применяют различные способы микроскопирования (световой, фазово-контрастный, люминесцентный, электронный) с применением оптических приборов.

Для световой микроскопии используют разные биологические микроскопы (micro — малый, scope — смотрю, вижу) — МБИ-1 и МБИ-2, при помощи которых достигается увеличение изображения объекта более чем в 2000 раз. Более совершенные модели микроскопов, например МБ-6, снабжены приспособлениями для фотографирования, фазово-контрастного и темнопольного микроскопирования.



а



б

Рис. 1. Схема устройства микроскопа МБР-1:

а) — внешний вид; б) — оптическая схема. 1 — башмак; 2 — коробка с микромеханизмом; 3 — предметный столик; 4 — тубусодержатель; 5 — монокулярный тубус; 6 — револьвер; 7 — кронштейн конденсора; 8 — конденсор; 9 — объектив; 10 — окуляр; 11 — микрометрический винт; 12 — макрометрический винт; 13 — стопорный винт верхней части столика; 14 — центрирующий винт для установки препарата; 15 — головка тубусодержателя; 16 — винт для крепления тубуса; 17 — винт для фиксации револьвера; 18 — зеркало; 19 — апертурная диафрагма; 20 — призма; 21 — рукоятка «ирис»-диафрагмы; 22 — винт перемещения конденсора; 23 — стопорный винт конденсора.

Устройство светового микроскопа. Микроскоп состоит из двух основных частей — механической и оптической (рис. 1).

Механическая часть включает штатив, предметный столик, трубку (тубус) с вращающимся диском-«револьвером» в нижней части, макро- и микрометрические винты для передвижения тубуса вверх и вниз. В центре предметного столика имеется отверстие для прохождения света. Боковые винты у столика обеспечивают его передвижение. На предметном столике специальными клеммами закрепляется предметное стекло с исследуемым материалом. Тубус подвижно прикреплен впереди верхней части штатива. Большим (макрометрическим) винтом с помощью зубчатки (кремальера) производят грубое, заметное простым глазом передвижение тубуса. Малым (микрометрическим) винтом также передвигают тубус вверх и вниз, но на очень малое расстояние, ощутимое только при микроскопировании. Полный оборот микрометрического винта передвигает тубус на 0,1 мм.

Оптическая часть микроскопа включает осветительный аппарат, объективы и окуляры.

Осветительный аппарат, расположенный под предметным столиком, состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой (рис. 2). Зеркало закреплено подвижно, имеет две

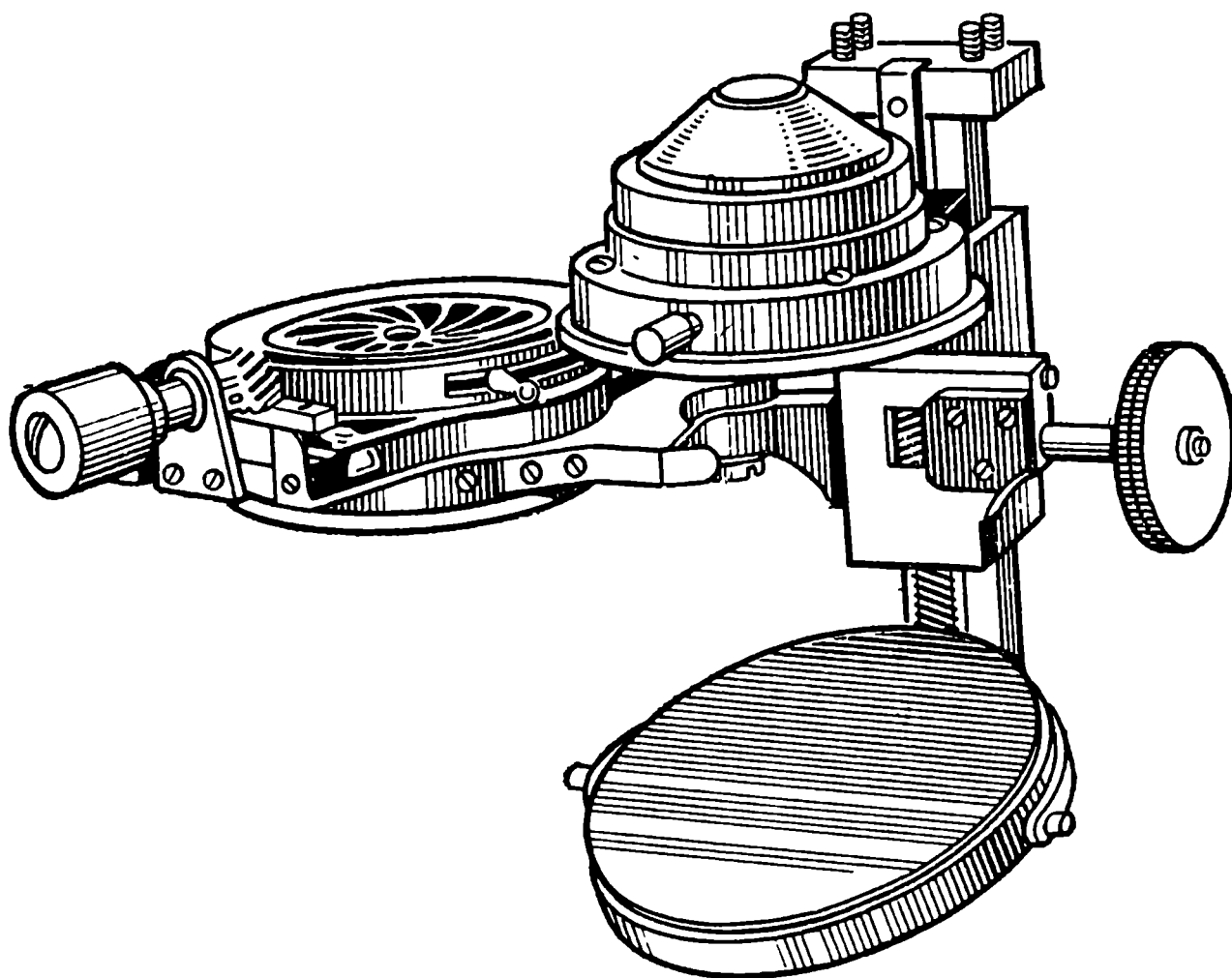


Рис. 2. Осветительный аппарат микроскопа (конденсор с диафрагмой и зеркалом),

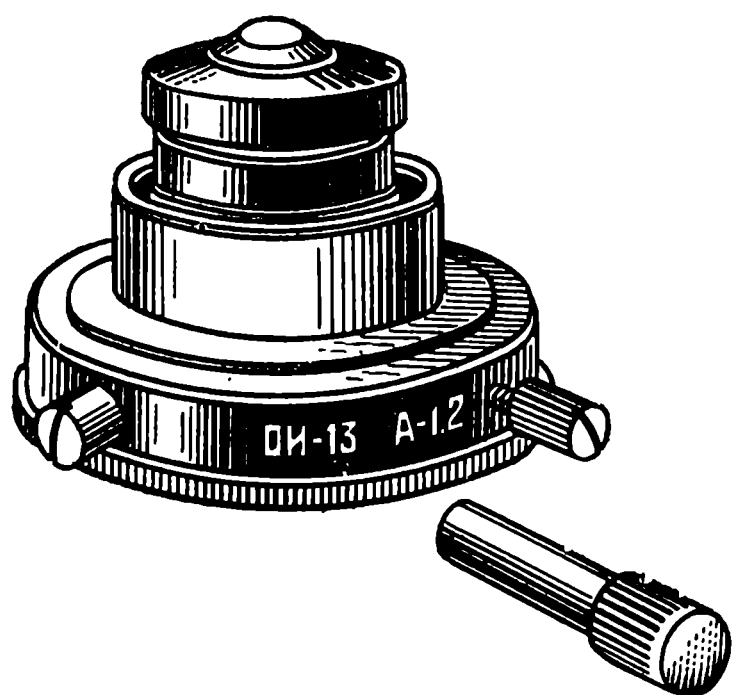


Рис. 3. Внешний вид темнопольного конденсора ОИ-13. Справа ключ.

поверхности — плоскую и вогнутую. При дневном свете пользуются плоской поверхностью, при искусственном источнике света — вогнутой. Конденсор — собиратель световых лучей, отраженных зеркалом, состоит из двух линз: верхней, обращенной к столику — плосковыпуклой, нижней — двояковыпуклой. Световые лучи, проходя через линзы конденсора, собираются в фокусе на уровне рассмат-

риваемого препарата. Для уменьшения освещенности поля зрения при помощи бокового винта конденсор опускают, для увеличения доступа света — поднимают. В нижней части конденсора прикреплена «ирис»-диафрагма, состоящая из полукруглых металлических пластинок, заходящих одна на другую. Специальным рычажком эти пластинки раздвигаются и сдвигаются, увеличивая или уменьшая отверстие для прохождения света. Описанный конденсор Аббе широко используется, но в отдельных случаях, например, при рассматривании лептоспир, его заменяют специальным темнопольным конденсором (рис. 3). Последний отличается тем, что пропускает только косые, краевые лучи источника искусственного света, которые из-за сильного их наклона не попадают в объектив, поэтому поле зрения темное. Если в препарате имеются частицы различной оптической плотности, то косые лучи, проходящие через конденсор, встречаясь с плотными частицами, отклоняются ими (дифрагирование света). Дифрагированные лучи распространяются во всех направлениях под разными углами, попадают в объектив, что дает на темном фоне свечение. Яркость свечения зависит от силы источника света, точности наводки. Предварительно освещение поля зрения устанавливают с помощью обычного конденсора, затем его заменяют темнопольным; освещают сильными специальными лампами для микроскопирования типа ОИ-7, ОИ-19. На верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла или дистиллированной воды (избегая образования пузырьков воздуха), фиксируют препарат, делают наводку объекти-

ва, центрируют конденсор по отношению к оптической оси объектива. Далее системой винтов регулируют видимость объекта в поле зрения.

Объектив — важнейшая часть микроскопа, ввинчивается в отверстие «револьвера». Состоит он из нескольких линз, закрепленных в металлический футляр. Главная линза — фронтальная (передняя, видимая снаружи), направленная к препарату. Она обеспечивает необходимое увеличение изображаемого объекта. От фронтальной линзы зависит разрешающая способность микроскопа, то есть его возможность дать изображение объекта между двумя наиболее близко расположенными точками. Обычно предельная разрешающая способность объективов световых микроскопов 0,2 мкм (объекты меньших размеров невидимы). Чем больше кривизна фронтальной линзы (меньше фокусное расстояние), тем больше степень ее увеличения.

Помимо фронтальной линзы, в металлической оправе расположены еще несколько коррекционных линз (от 3—4 до 10—12), которые обеспечивают четкость изображения, устраняя хроматическую и сферическую абберации (разложение луча на спектр, неравномерность видимости в центре поля зрения и по периферии и др.). Чем больше степень увеличения фронтальной линзы, тем больше требуется коррекционных линз.

Различают объективы сухие и погружные (водные и масляные), то есть иммерсионные (рис. 4). При пользовании сухими объективами между фронтальной линзой объектива и препаратом (на предметном столике) имеется прослойка воздуха. Световые лучи, проходящие через стекло препарата, попадая в воздушную прослойку, преломляются, отклоняются и только часть их проникает в объектив. Осве-

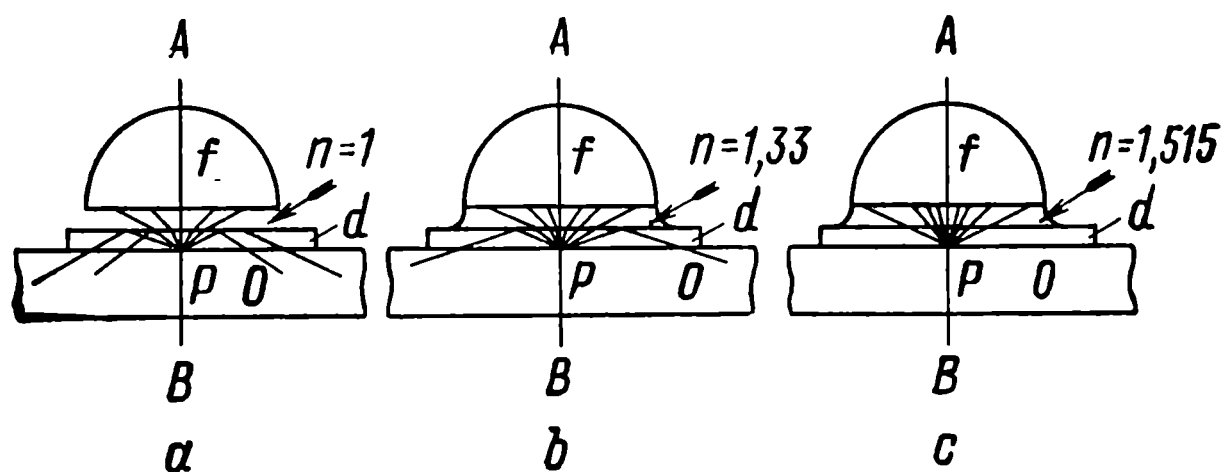


Рис. 4. Ход лучей в (а) сухом, (б) водно- и (с) — масляно-иммерсионном объективе:

n — показатель преломления; PO — препарат; f — фронтальная линза объектива; d — покровное стекло.

щение в этом случае будет достаточным, если диаметр фронтальной линзы объектива сравнительно большой. Такие линзы имеют большое фокусное расстояние, малую кривизну, поэтому дают небольшую степень увеличения изображения (в 10, 20 и 40 раз).

Для изучения бактерий увеличение фронтальной линзы должно быть в 80, 90, 100 и 120 раз. У таких линз большая кривизна и короткое фокусное расстояние, следовательно, маленький диаметр. Чтобы освещенность поля зрения была достаточной, нужно, чтобы световые лучи между фронтальной линзой и препаратом не рассеивались. Для этого на микроскопируемый препарат наносят каплю жидкости, имеющей коэффициент преломления света, близкий к коэффициенту преломления стекла препарата. В эту каплю жидкости погружают фронтальную линзу объектива (иммерсионные объективы); образуется оптически однородная среда, в которой световые лучи не рассеиваются, а проходят через фронтальную линзу, хорошо освещая поле зрения. В качестве иммерсионной жидкости обычно используют кедровое масло, иногда вазелиновое масло и др.

Окуляр вставляется в верхнюю часть тубуса, состоит из верхней глазной и нижней собирательной линз, заключенных в металлическую оправу. Окуляр увеличивает изображение, данное объективом. В монокулярном микроскопе (один окуляр) изображение получается плоское, в бинокулярных микроскопах (два окуляра) изображение объемное, стереоскопическое. На верхней рамке окуляра имеется числовое обозначение со знаком умножения — показатель увеличения окуляра. Общее увеличение изображения объекта определяют умножением степени увеличения объектива на степень увеличения окуляра.

Правила работы с микроскопом. Приступая к работе с микроскопом, необходимо проверить состояние конденсора: он должен быть поднят до уровня предметного столика, диафрагма открыта. Приподняв тубус микроскопа, поворотом револьвера устанавливают объектив с наименьшим увеличением (8, 10 раз); глядя в окуляр, вращают зеркало до получения полного освещения поля зрения. Затем на исследуемый препарат наносят каплю кедрового масла, препарат помещают на предметный столик, легким вращением револьвера устанавливают иммерсионный объектив (ОИ 80, 90, 100) так, чтобы он был продолжением тубуса, и во избежание соприкосновения объектива со столиком тубус следует держать в высоко приподнятом положении. Затем под конт-

ролем глаза (смотреть сбоку) фронтальную линзу объектива осторожно погружают в каплю масла легким поворотом макрометрического винта. После этого нужно смотреть в окуляр и осторожно приподнимать тубус до видимости препарата. Не отрывая глаз от микроскопа, легким поворотом микрометрического винта вперед-назад регулируют четкость изображения. В конце работы тубус осторожно приподнимают, револьвер переводят в нейтральное положение, масло с линзы осторожно снимают лоскутком замши или мягкой тряпочкой.

Микроскоп убирают в деревянный футляр или накрывают стеклянным колпаком (лучше цветного стекла) для защиты от света.

Люминесцентная микроскопия. Некоторые вещества под влиянием избыточной энергии (например, нагревание) светятся. Чем выше температура, тем интенсивнее свечение. Активизация свечения может произойти не только от нагревания, но и от других источников энергии. Слабое свечение объекта получило название *люминесценции* (лат. *lumen* — свет, *escentio* — суффикс), обозначающее слабое действие.

Способностью люминесцировать обладают многие вещества. Последние, способные ярко люминесцировать, называют *люминофорами* (люминогенами, флуорохромами). Они светятся и после удаления действия возбуждающего фактора. Если люминесценция продолжается в течение 10^{-9} — 10^{-7} секунд, ее называют *флуоресценцией*. В случае более длительного люминесцирования свечение называют *фосфоресценцией*. В зависимости от источника энергии различают фото-, электро-, радио-, хими-, рентгенолюминесценцию. В лабораторной практике в основном используют фотолюминесценцию или флуоресценцию. Различают первичную и вторичную люминесценцию. Первичная люминесценция возникает при облучении необработанного объекта за счет свечения вещества этого объекта. В биологии, ветеринарии и медицине чаще применяют вторичную люминесценцию, возникающую при обработке объекта специальными люминесцирующими красителями. Для этого препараты со слабой собственной люминесценцией обрабатывают флуоресцирующими красителями, которые, локализуясь в отдельных участках клеток, тканей, обнаруживаются при люминесцентной микроскопии. Люминесценция зависит от характера люминесцирующего вещества, температуры, pH растворителя, концентрации вещества и др. Наиболее часто

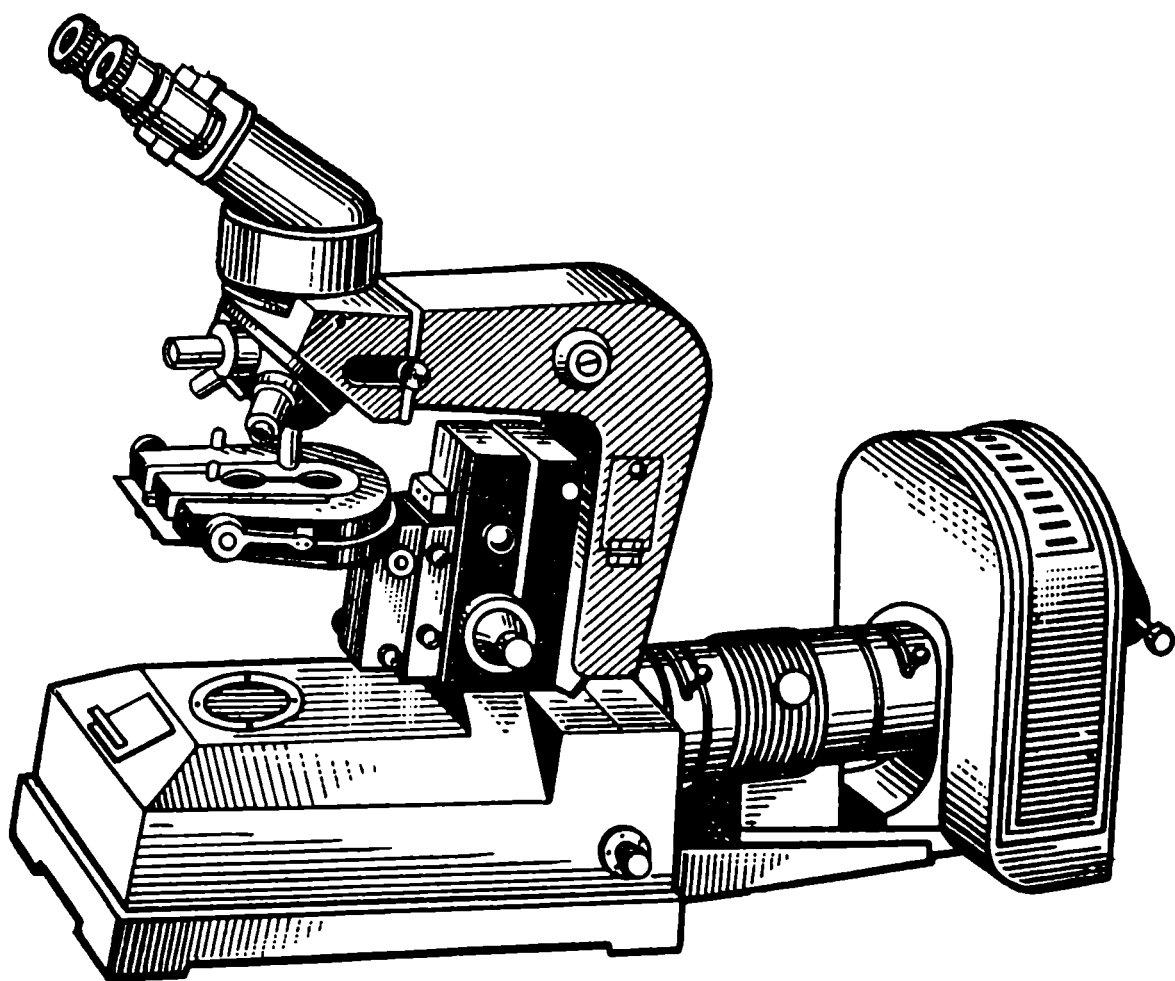


Рис. 5. Люминесцентный микроскоп МЛ-2.

для люминесцентной микроскопии используют следующие флюорохромы: акридин оранжевый, аурамин, флюоресцеин, уранин, родамин и др.

В основе люминесцентной микроскопии лежит способность микроскопических объектов флюоресцировать под воздействием коротковолновых лучей, обладающих наибольшей энергией возбуждения. Свет люминесценции имеет большую длину волны, чем свет возбуждающий (закон Стокса), что дает возможность видеть флюоресцирующие структуры, участки микроскопического препарата. При этом большое значение имеет мощность источника света (максимум излучения в коротковолновой части спектра — ультрафиолетовой и фиолетово-синей) на небольшой площади препарата.

Наша промышленность выпускает люминесцентные устройства ОИ-17, устанавливаемые на микроскопы МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-4, люминесцентные осветители ОИ-28, ОИ-30 (применяемые в сочетании с любым биологическим световым микроскопом) и специальные люминесцентные микроскопы МЛ-1, МЛД-1 дорожный для проведения работы в полевых условиях, в автолабораториях или в стационарных условиях, МЛ-2, МЛ-3, МЛ-4 и др. (рис. 5).

Общим для люминесцентных микроскопов является наличие люминесцентного устройства (источник света с боль-

шой поверхностной яркостью), осветительного устройства и микроскопа.

К люминесцентному устройству относится источник возбуждения света (ртутно-кварцевые лампы сверхвысокого давления и дуговые лампы). Люминесцентные устройства и микроскопы оснащены специальными лампами СВД-120А, ДРШ-250, ДРШ-100, СВДШ-250-3. Максимум излучающей энергии ртутных ламп сверхвысокого давления находится в области длины волн от 300 до 420 мкм, что соответствует чувствительности наиболее часто употребляемых в практике флюорохромов. В настоящее время появились новые источники света — лампы накаливания с йодным циклом (КИМ-9-75).

Осветительное устройство люминесцентного микроскопа состоит из кварцевого коллектора (конденсора), полевой диафрагмы осветителя и светофильтров. Светофильтры возбуждающего света (светофильтры возбуждения) служат для выделения нужной части спектра, то есть коротковолновых невидимых (ультрафиолетовых) лучей и коротковолновых видимых фиолетово-синих отрезков спектра. К ним относят УФС-3, ФС-1, СС-14. Указанные фильтры пропускают красные и инфракрасные лучи, которые вызывают тепловое гашение люминесценции и этим мешают рассмотрению люминесценции. Поэтому такие светофильтры используют с теплозащитными сине-зелеными фильтрами из стекол СЗС-7, СЗС-14 или на пути светового пучка между источником света и светофильтрами возбуждения ставят кювету с дистиллированной водой или раствором медного купороса. После возникновения флюоресценции объекта под действием возбуждающих лучей последние нужно полностью устранить защитными запирающими светофильтрами, которые устанавливают на окуляре или в тубусе между объективом и окуляром.

Для поглощения ультрафиолетовых, фиолетовых и синих лучей используют светофильтры желтого цвета, применяя принцип скрещенных светофильтров: если запирающие светофильтры из стекла ЖС-3, то фильтры возбуждения из стекла УФС-3; если запирающие светофильтры из стекла ЖС-18 или желатиновые с тертрациновым красителем Т-2Н и Т-1Н, то применяют светофильтры возбуждения Ф-1, СС-4, СС-8, СС-14.

Принцип скрещенных фильтров заключается в наиболее эффективном сочетании двух светофильтров, один из которых должен пропускать часть спектра, необходимую для

возбуждения флуоресценции; второй должен полностью поглощать первичный возбуждающий свет, но пропускать весь свет флуоресценции исследуемого объекта.

М и к р о с к о п в л ю м и н е с ц е н т н о й у с т а - н о в к е служит для получения увеличенного изображения микроскопических объектов в свете их люминесценции. В зависимости от направления освещения препаратов возбуждающим светом, различают люминесцентную микроскопию в проходящем и падающем свете. Падающий свет обеспечивают люминесцентным отечественным opak-иллюминатором, повышающим яркость флюоресцирующих микроскопических объектов, рассматриваемых с помощью иммерсионных объективов (последние обозначаются буквой «Л»). Opak-иллюминатор имеет светоогделительную пластинку, покрытую специальным интерференционным веществом, расположенную под углом 45° ; она избирательно отражает около 90% возбуждающего излучения и пропускает свет люминесценции в таком же количестве.

Люминесцентная микроскопия имеет преимущества по сравнению с обычной: дает цветное изображение, высокую степень контрастности, возможность исследования живых бактерий в исследуемом материале и в небольших количествах. Люминесцентная микроскопия в сочетании со специфическими иммунными реакциями нашла свое практическое использование в методике люминесцирующих (флюоресцирующих) антител (МФА) (см. стр. 107).

Фазово-контрастная микроскопия основана на изменении фазы световой волны, проходящей через объекты, вследствие чего повышается контрастность изображения. Последнее достигается особым устройством, изменяющим фазы колебания и амплитуды световых волн, проходящих через объект исследования. Такое устройство состоит из кольцевой диафрагмы и набора объективов (например, КФ-4). В объективах находятся фазовые пластинки в виде кольца (рис. 6). С помощью изменений, вызываемых данным устройством, даже неокрашенные объекты становятся видимыми в микроскопе.

При фазово-контрастной микроскопии конденсор обычного светового микроскопа заменяют специальным конденсором, подставку ксторого вращают вправо до появления в отверстии нулевого обозначения («0»). Объективы микроскопа заменяют фазовыми с увеличением в 10, 20, 40 раз и иммерсионным (увелич. 90) из набора КФ-4. Плоскую поверхность зеркала устанавливают под углом 45° . Исследуе-

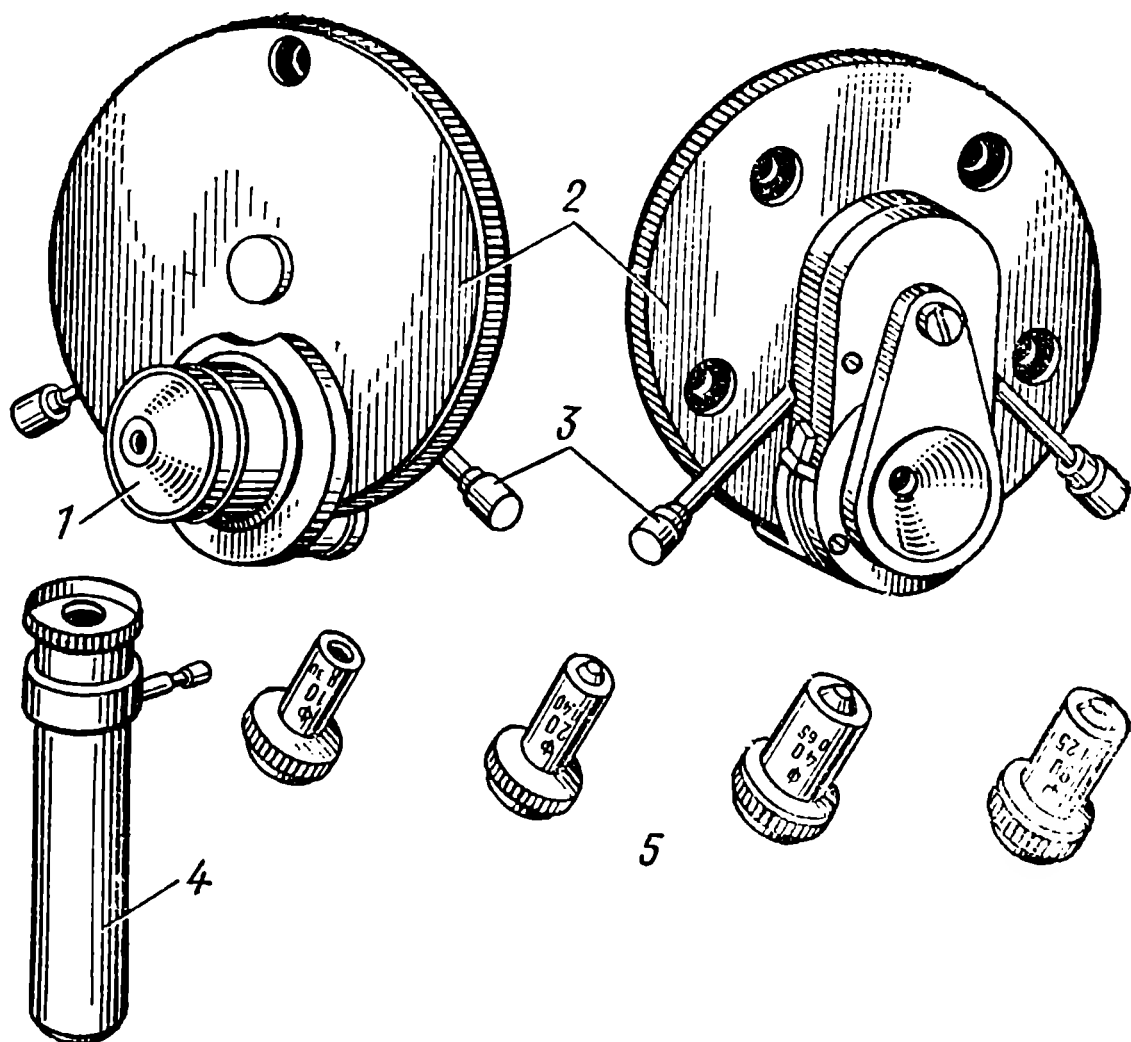


Рис. 6. Фазово-контрастное устройство КФ-4:

1 — конденсор; 2 — револьверный диск с набором кольцевых диафрагм; 3 — центрировочные винты; 4 — вспомогательный микроскоп; 5 — набор фазовых объективов.

мый препарат помещают на предметный столик, закрепляют клеммами, малым увеличением объектива устанавливают освещение по Келлеру: на зеркало помещают листок белой бумаги, на котором видно изображение нити электролампы осветителя.

Освещенность препарата по Келлеру должна быть максимальной. Фазовое кольцо объектива устанавливают в фокусе по зрению наблюдателя. Окуляр заменяют на вспомогательный микроскоп МИР-4, входящий в комплект. Полностью открывают диафрагму конденсора. Револьвер конденсора вращают по часовой стрелке до появления в его отверстии цифры «20». При рассмотрении пользуются вспомогательным микроскопом и с помощью центрирующих колец находят их изображение. Вспомогательный микроскоп заменяют окуляром и исследуют препарат. Каждый раз при замене объектива или препарата проверяют центровку кольцевой диафрагмы с фазовым кольцом.

Для фазово-контрастной микроскопии необходимо пользоваться только обезжиренными предметными и покровными стеклами.

Электронный микроскоп — прибор для изучения тонких ультраструктур микроорганизмов, клеток животных и

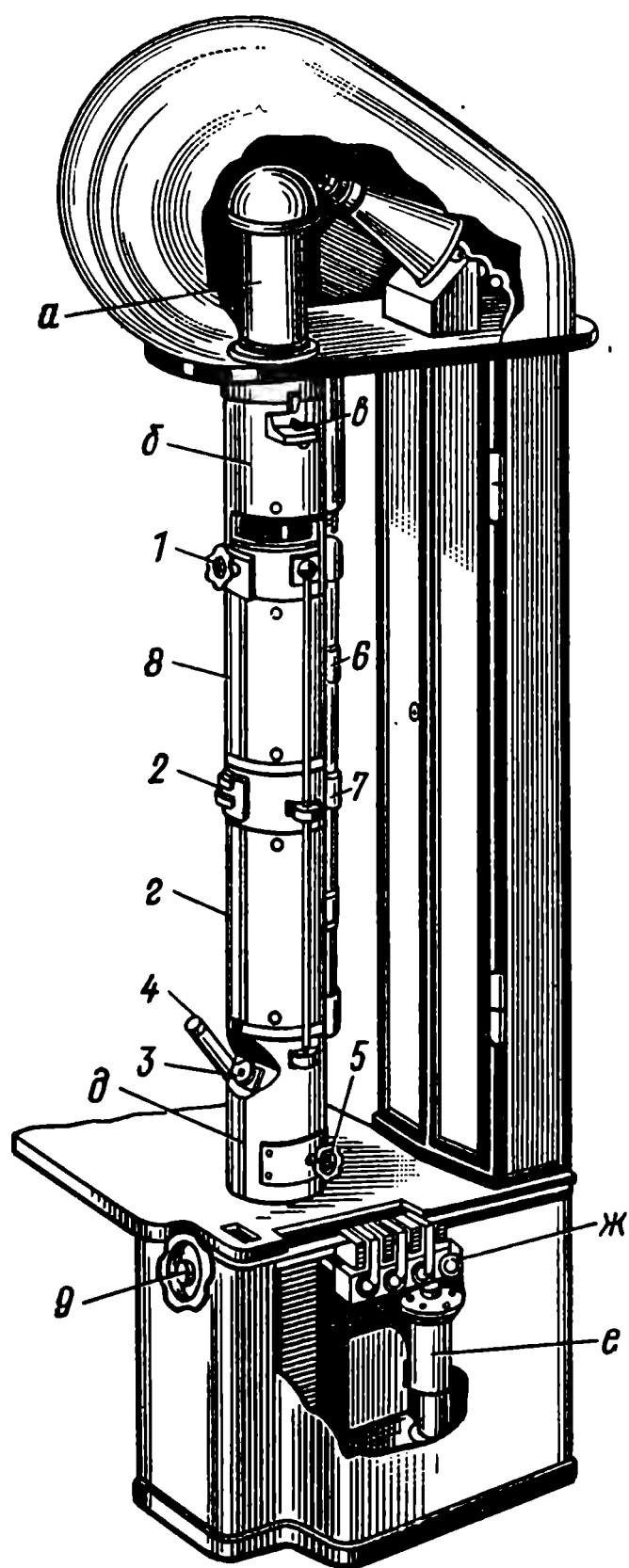


Рис. 7. Схематический чертеж магнитного электронного микроскопа ГОИ:

а — пушка; *б* — конденсорная линза; *в* — линза объектива; *г* — проекционная линза; *д* — фотокамера; *е* — диффузионный масляный насос; *ж* — клапанный переключатель вакуума. *1* — люк для смены объекта; *2* — окошко для наблюдения промежуточного изображения; *3* — окошко для наблюдения конечного изображения; *4* — световой микроскоп; *5* — люк для смены фотопластинок; *6* — вакуум-провод; *7* — поводки передвижения объектива; *8* — ручка управления пушкой; *9* — ручка управления вакуумной системой микроскопа.

растительных тканей. При помощи электронного микроскопа достигается увеличение изображения объекта более чем в 500 000 раз. Степень их увеличения измеряется в ангстремах ($\text{\AA} = 0,00000001$ см). Существуют различные отечественные и зарубежные модели электронных микроскопов.

На рисунке 7 представлена схема устройства электронного микроскопа, в которой различают: цилиндрическую колонку с расположенной внутри нее «пушкой», то есть источником электронов, а также три электромагнит-

ные линзы (конденсорная, объективная, проекционная), предметный столик, экран для изображения, окуляр. Для обеспечения работы микроскопа необходим вакуумный насос, источник электропитания.

Принцип действия электронного микроскопа основан на том, что от вольфрамовой нити, нагретой электрическим током, электроны движутся с большой скоростью, возникающей за счет электрического напряжения между вольфрамовой нитью и анодом. Через отверстие анода электроны движутся по инерции в конденсорную линзу, затем на исследуемый объект. После этого электроны отклоняются от первоначального направления, проходят через диафрагму линзы объектива, увеличивают промежуточное изображение,

которое затем усиливается проекционной линзой и дает изображение на светящемся (флюоресцирующем) экране. Данное изображение основано на различной плотности электронов в разных участках объекта, имеющих неодинаковую яркость. Если на всем экране (при однородности исследуемого объекта) плотность электронов одинаковая, прохождение последних не задерживается, экран светится равномерно и никакого изображения на нем не будет.

Вопросы для самопроверки. 1. Устройство осветительной части светового микроскопа. 2. Принцип устройства конденсора «темное поле». 3. Основные оптические части микроскопа, его разрешающая способность, определение степени увеличения микроскопа. 4. Системы объективов. Фронтальная линза, ее назначение. Назначение коррекционных линз. 5. Назначение и правила работы с макро- и микрометрическими винтами. 6. Устройство люминесцентного микроскопа. 7. В чем отличие первичной и вторичной люминесценции? 8. Светофильтры «возбуждения»; запирающие светофильтры. 9. Опак-иллюминатор, его назначение. 10. Назначение микроскопа при люминесцентной микроскопии. 11. Основные составные части электронного микроскопа, их назначение. 12. На чем основан принцип электронной микроскопии?

МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

По форме бактерии подразделяют на шаровидные (кокки), цилиндрические (или палочковидные) и извитые (рис. 8). Среди шаровидных форм, в зависимости от расположения кокковых клеток после их деления, различают: *стафилококки* (беспорядочно расположенные клетки, иногда образующие скопления в виде грозди винограда), *диплококки* (кокки, расположенные попарно), *тетракокки* (результат деления клетки в двух взаимно перпендикулярных направлениях — сохраняются вместе четыре кокка), *стрептококки* (кокки, расположенные в виде цепочки) и *сарцины* (скопление кокков в форме «тюков», «пакетов».)

Палочковидные бактерии делят на две группы. Одна группа бактерий, образующая в неблагоприятных условиях устойчивую форму существования — споры, называется *бациллами*, другая группа, не образующая споры, сохраняет название *собственно бактерий*.

Извитые формы также неоднородны в своем родовом и видовом составе. Среди них различают *вибрионы*, тело которых представляет неполный один завиток в виде запятой; *спириллы* — микроорганизмы с несколькими крупными завитками; *спирохеты* и *лептоспиры* — особые группы микроорганизмов с множеством мелких завитков вдоль осевой нити.

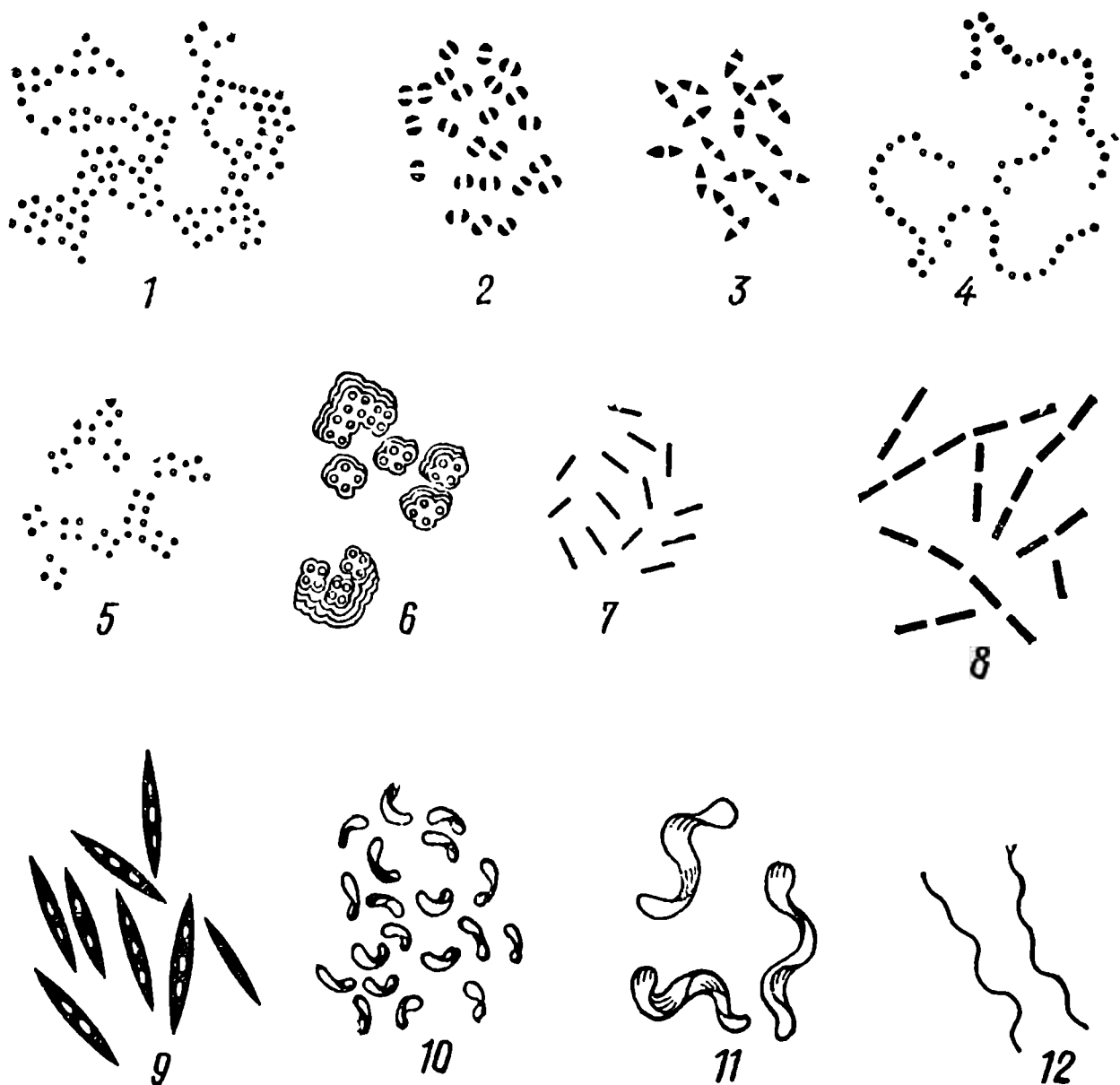


Рис. 8. Основные формы бактерий:

1 — стафилококки; 2, 3 — диплококки; 4 — стрептококки; 5 — тетракокки; 6 — сарцины; 7, 8, 9 — различные виды палочек; 10 — вибрионы; 11 — спириллы; 12 — спирохеты

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА ДЛЯ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ. МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроскопируют микробы в живом и неживом состоянии. Для изучения внешней формы и структурных элементов клетки, тинкториальных свойств (способность микробов к окраске) готовят специально окрашенный препарат, применяя для этого различные анилиновые красители.

Краски и красящие растворы. Наиболее часто в микробиологической практике используют следующие анилиновые краски:

а) фуксин (основной), метиловый красный, нейтральный красный — в растворе имеют красный цвет; б) кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет, готовая жидкая краска Гимза (азур-эозин) фиолетового цвета; в) метиленовая синь (синька), бриллиантовая и малахитовая зелень.

Из сухих кристаллических или порошкообразных красителей готовят водные или спиртовые растворы красок. Последние обычно готовят впрок, они хорошо сохраняются

в темном месте (или в посуде из темного стекла). Чтобы усилить действие красящих растворов на микробную клетку, используют различные протравители. Последние добавляют в раствор красителя (фенол, едкий калий) или ими обрабатывают препарат перед окрашиванием (слабые растворы соляной, серной или хромовой кислоты). Для протравы применяют также прогревание препарата с налитой на него краской или предварительно подогревают раствор краски и окрашивают ею в горячем виде. Краски, нестойкие в растворе, не сохраняющиеся длительное время, готовят только непосредственно перед употреблением в виде 1—2%-ного раствора.

С п и р т о - в о д н ы е р а с т в о р ы. *Карболовый фуксин* (фуксин Циля). Кристаллы основного фуксина предварительно растворяют в 96°-ном этиловом спирте. Сначала готовят насыщенный спиртовой раствор (на 5—10,0 краски 100 мл спирта). Для лучшего и более быстрого растворения кристаллы краски предварительно растирают в фарфоровой ступке в небольшом количестве спирта с добавлением нескольких капель глицерина. Чисто спиртовой раствор для окраски непригоден, поэтому готовят спирто-водный раствор: 10—20 мл насыщенного спиртового раствора фуксина + 100 мл дистиллированной воды с 5% фенола (протрава). Полученный раствор фуксина фильтруют через фильтровальную бумагу. В ряде случаев фуксин Циля перед использованием разбавляют еще раз дистиллированной водой (1 : 10) и получают рабочий раствор фуксина (фуксин Пфейффера).

Карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет. Первые два красителя в растворе очень быстро выпадают в осадок и при окрашивании могут исказить микроскопическую картину. Чаще используют генцианвиолет, который получают смешением метил- и кристаллвиолета с добавлением декстрина, он дает более ровное окрашивание. 1 г сухого генцианвиолета растворяют в 10 мл спирта, растирая в ступке с глицерином и кристалликами фенола (2%), затем добавляют дистиллированную воду. Чтобы избежать образования осадка при хранении раствора, листы фильтровальной бумаги пропитывают насыщенным спиртовым раствором краски, высушивают их на воздухе, нарезают мелкими полосками или квадратиками и сохраняют в темной банке с притертой пробкой.

При окраске препарата на него накладывают высушенную полоску с генцианвиолетом, сверху наливают несколько капель воды, выдерживая 2—3 мин.

Раствор метиленовой синьки (щелочная синька Лёффлера). Для приготовления раствора 3,0 краски настаивают длительное время (3—4 мес.) в 100 мл 96°-ного спирта, затем 30 мл насыщенного раствора разбавляют в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 1 мл 1%-ного раствора едкого калия (протрава). Фильтруют.

Водные растворы. *2%-ный сафранин*: 2,0 сухого красителя заливают 100 мл горячей дистиллированной воды, пропускают через бумажный фильтр и сразу используют свежий раствор для окрашивания.

1%-ный раствор малахитовой зелени: на 1,0 кристаллической краски берут 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют ее, остужают и используют для окрашивания. При специальных методах окрашивания бактериальных препаратов применяют готовую жидкую краску *азур-эозин* (краска Гимза), но перед употреблением ее необходимо разбавить дистиллированной водой (1 : 10). В краске сразу образуется осадок. Чтобы последний не влиял на препарат, окрашивание проводят, по рекомендации Романовского, следующим образом: на дно чашки Петри кладут стеклянные палочки или спички с обломанными головками, на них помещают препарат мазком вниз, раствор краски подливают под препарат (метод Романовского — Гимза).

Приготовление микроскопических препаратов. Для микроскопического исследования с целью выявления форм микробов и их структурных и некоторых биохимических особенностей препарат готовят на предметном стекле. В качестве материала применяют взвеси бактерий, непосредственно бактериальную культуру, выросшую на жидкой или плотной среде, молоко, кровь, гной (препарат-мазок); кроме того, используют отпечатки ткани печени, селезенки или других органов (препарат-отпечаток, кляч-препарат).

Для приготовления препарата на рабочем столе должно быть: исследуемый материал (взвесь бактерий, микробные культуры, гной и др.), обезжиренные предметные стекла, бактериологическая петля (рис. 9), газовая (или спиртовая) горелка, бутыл (с сифоном) дистиллированной воды, сливная чашка с «мостиком» (рис. 10), красители, фиксирующие и протравливающие жидкости.

Из *жидкой микробной культуры* (или гноя) для приготовления препарата-мазка в левой руке держат пробирку с названным материалом, в правой — бактериологическую петлю (как пишущее перо), тщательно прожигают ее на пламени горелки и, не выпуская из рук, осторожно около пла-

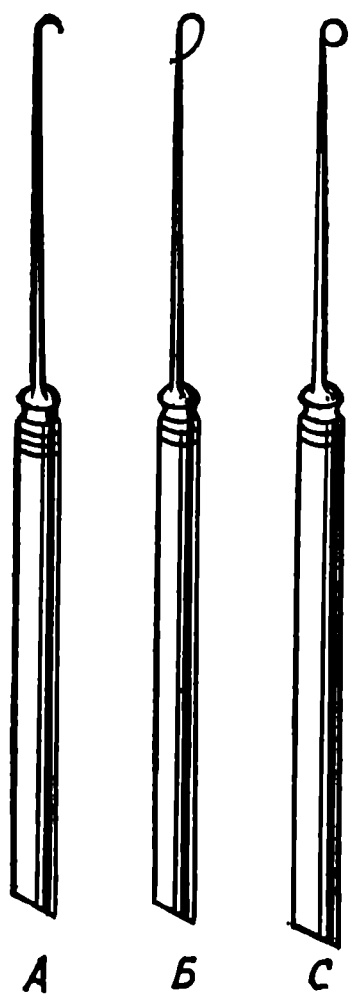


Рис. 9. Бактериологические петли:

А и Б — неправильно сделанные;
С — правильно сделанная.

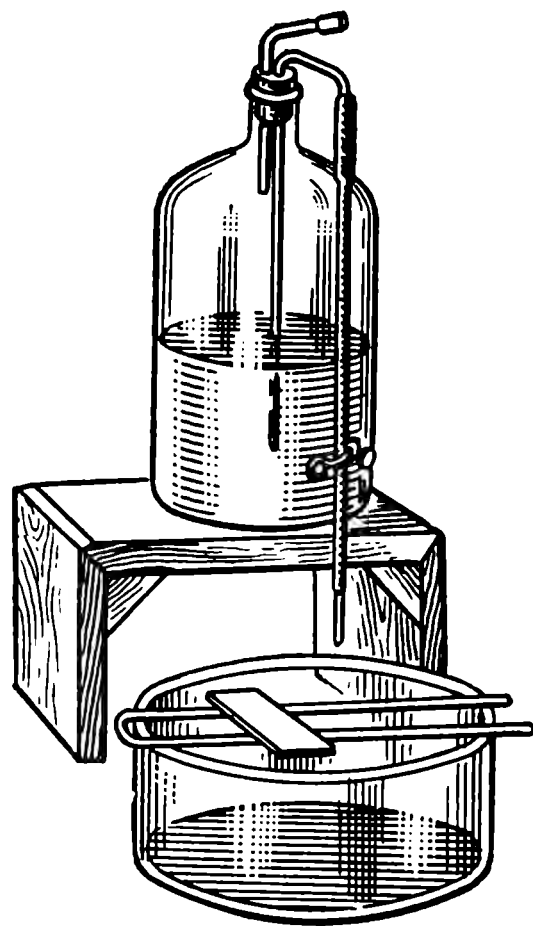


Рис. 10. Прибор для промывания препаратов (мазков).

мени открывают пробирку свободными пальцами правой руки (мизинцем и безымянным), петлей захватывают каплю материала, пробирку закрывают и ставят в штатив. Свободной левой рукой берут предметное стекло, наносят на его поверхность каплю и легкими круговыми движениями растирают по стеклу, затем препарат высушивают на воздухе (рис. 11), петлю прожигают.

Высохший препарат фиксируют — закрепляют на стекле. Для этого чаще пользуются физическим способом: препарат (обратной стороной мазка) 2—3 раза слегка проводят над пламенем горелки. Из фиксирующих химических средств используют эфир, этиловый или метиловый спирт, формалин, смеси формалин-спирт, спирт-эфир. Для фиксации высушенный препарат помещают в стаканчик с фиксирующей жидкостью (или 1—2 капли жидкости наносят на препарат) и выдерживают 3—5 мин. Затем мазок промывают, высушивают фильтровальной бумагой. С обратной стороны стекла препарата восковым цветным карандашом обводят границу (зону) мазка, чтобы после окраски точно знать место его нахождения.

Для приготовления препарата из *бактериальной культуры*, выросшей на плотной среде, на предметное стекло петлей наносят каплю стерильного физиологического раствора,

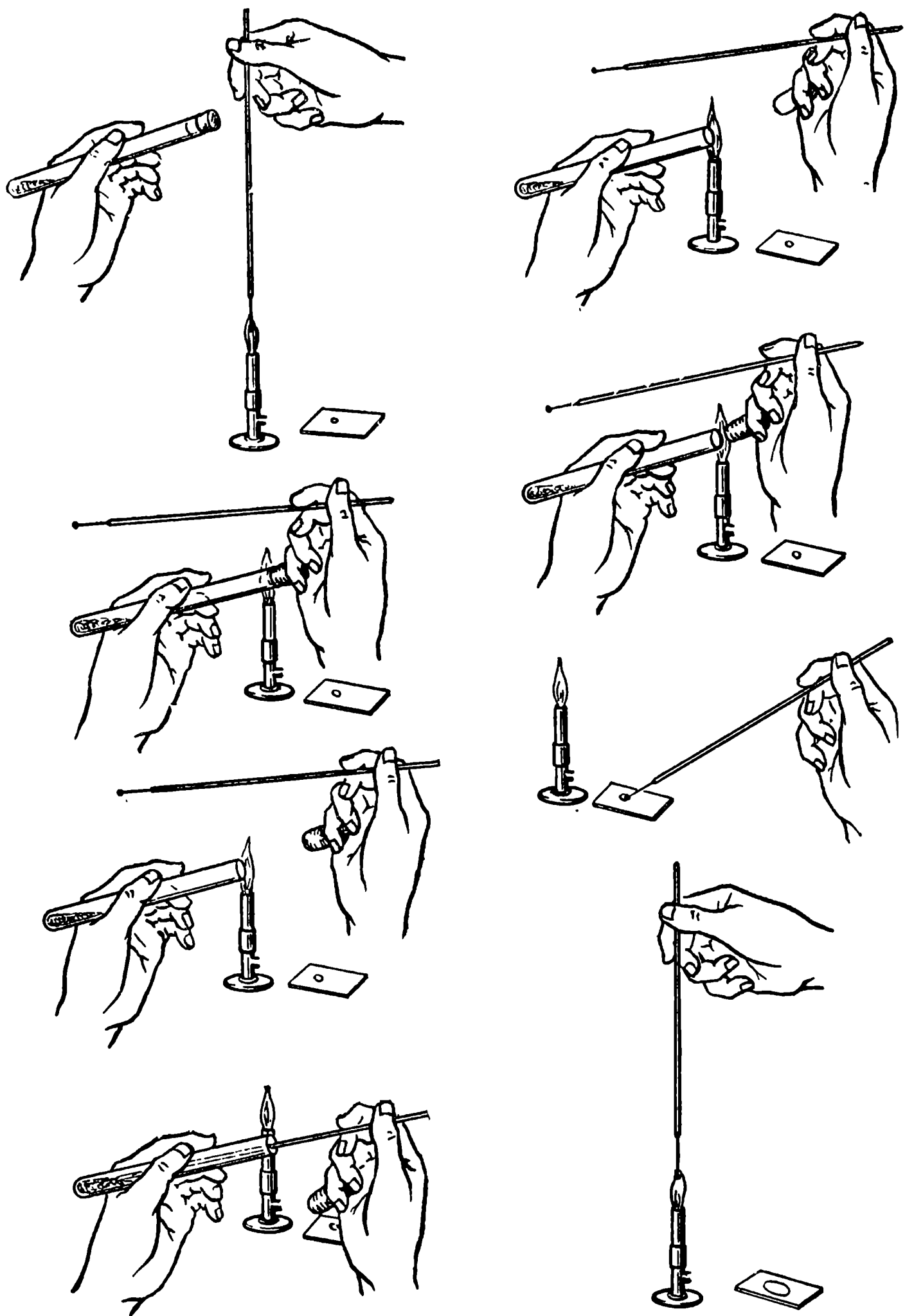


Рис. 11. Схема приготовления препарата-мазка.

затем, прокалив петлю на огне, берут ею очень небольшое количество микробной массы из пробирки с поверхности среды и аккуратно растирают в капле физиологического раствора на предметном стекле тонким равномерным слоем. В остальном поступают, как описано выше.

Некоторые методы окрашивания препаратов. Препараты окрашивают простым и сложными методами.

При простом методе окраски используют только один какой-либо краситель. На фиксированный препарат, помещенный на «мостике» над сливной чашкой, наливают раствор либо метиленовой синьки (окрашивают 4—5 мин), либо карболовый фуксин Пфейффера (1—2 мин) или карболовый генцианвиолет (1—2 мин). Краску смывают водой из бутылки, препарат высушивают фильтровальной бумагой. На готовый препарат наносят каплю иммерсионного масла, помещают на предметный столик и микроскопируют.

Сложные (дифференцирующие) методы окраски отличаются от простых тем, что препарат окрашивают несколькими красками, а в отдельных случаях используют еще специальные реактивы (раствор Люголя, кислоты и др.). Сложные методы позволяют выявить наличие (или отсутствие) отдельных структурных элементов и некоторых органических соединений клетки, чем и определяют тинкториальные свойства каждого вида микроба.

Метод окраски по Граму. Фиксированный препарат окрашивают карболовым генцианвиолетом 2—3 мин; не смывая водой, краску сливают и на 2—3 мин на препарат наносят раствор Люголя (йода кристаллического — 1,0; йодистого калия как растворителя йода — 2,0; дистиллированной воды — 300 мл). Раствор Люголя сливают, не промывая водой; препарат обрабатывают 96°-ным спиртом 30 с, затем хорошо промывают водой. После этого препарат дополнительно окрашивают рабочим раствором фуксина до 1 мин, вновь промывают водой, сушат фильтровальной бумагой и микроскопируют.

При окраске по Граму одни виды бактерий не обесцвечиваются спиртом после первичного окрашивания и сохраняют фиолетовый цвет; их называют *грамположительными*. Другие виды обесцвечиваются спиртом, а затем воспринимают дополнительную окраску фуксином и приобретают розово-красный цвет; они получили название *грамотрицательных*. Объяснение механизма окрашивания по Граму основывается на структурных особенностях клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных групп микробов, длине и форме ее «пор», на неодинаковом строении муреинового слоя клеточной стенки микроорганизмов. Генцианвиолет (или кристаллвиолет) и нуклеиновые кислоты цитоплазмы в присутствии йода (раствор Люголя) образуют прочный комплекс, нерастворимый в воде и слабо растворимый в спирте. Поэтому при действии спиртом в те-

чение 30 с бактерии с многослойным муреиновым каркасом (у грамположительных) не обесцвечиваются. У грамотрицательных бактерий муреиновый слой имеет более крупные «поры», что облегчает прохождение спирта, и образовавшийся комплекс разрушается, клетка обесцвечивается.

Грамположительно окрашиваются Стафилококки — *Staphylococcus*, стрептококки — *Streptococcus*, диплококки — *Diplococcus*, сарцины — *Sarcina*, тетракокки — *Tetracoscus*, ацидофильная бактерия — *Bact. acidophilus*, молочнокислая (болгарская) палочка — *Bact. lactis*, азотфиксирующие бактерии — *Azotobacter*, сенная палочка — *Bac. subtilis*, капустная — *Bac. megatherium*, картофельная — *Bac. mesentericus*, корневидная — *Bac. mycoides*, нитрифицирующие бактерии — *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*; возбудители сибирской язвы — *Bac. anthracis*, злокачественного отека — *Clostridium septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*, столбняка — *Cl. tetani*, ботулизма — *Cl. botulinum*, рожи свиней — *Erysipelothrix insidiosa*, листериоза — *Listeria monocytogenes*, туберкулеза — *Mycobacterium* (*tuberculosis bovis*, *avium*), паратуберкулезного энтерита — *Mycobact. paratuberculosis*.

Грамотрицательно окрашиваются Все виды бактерий сем. *Enterobacteriaceae* (род *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter* и др.); возбудители: бруцеллеза — *Brucella*, пастереллеза — *Pasteurella multocida*, сапа — *Actinobacillus mallei*, мелиоидоза — *Malleomyces pseudomallei*, некробактериоза — *Fusobacterium necrophorum*, вибриоза — *Campylobacter foetus*, лептоспироза — *Leptospira*, микоплазмозов — *Mycoplasma*, риккетсиозов — *Rickettsia*; туляремии — *Francisella tularensis*; уксуснокислые бактерии — *Bact. acetici*, синегнойная палочка — *Pseudomonas aeruginosa*, чудесная палочка — *Serratia marcescens*.

Методы окраски кислото-спирто-щелочеустойчивых бактерий. Микробы данной группы (микобактерии туберкулеза, паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота, проказы человека и др.) относятся к грамположительным бактериям. Для их дифференциации применяют специальные методы окрашивания, основанные на различной химической структуре цитоплазмы и клеточной оболочки названных видов бактерий. В их составе имеется значительное количество жировосковых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтионовой кислоты до 40%). Эти бактерии трудно воспринимают краски, но если они окрасились при воздействии протравителя, то трудно уже обесцвечиваются кислотами, спиртами и щелочами.

Наиболее распространенным методом окраски бактерий данной группы является метод *Циль — Нильсена*. На фиксированный препарат кладут листок белой фильтровальной бумаги (для предохранения от осадка), на него наливают раствор карболового фуксина, снизу препарат подогревают над пламенем до появления паров и оставляют на «мостике» 5—7 мин, затем краску с бумажкой сливают (не промывая) и обесцвечивают 3—5%-ным раствором серной кислоты 5—7 с, хорошо промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовой синькой Лёффлера 4—5 мин. В заключение препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Кислотоустойчивые (спирто-щелочеустойчивые) бактерии окрашиваются в красный цвет (не обесцвечиваются кислотой), некислотоустойчивые — в синий, так как легко окрасившись фуксином, они легко обесцвечиваются кислотой, затем воспринимают вторичную окраску синькой.

Методы окраски непостоянных элементов микробной клетки. В структуре микробной клетки различают постоянные и непостоянные элементы. Постоянные — это цитоплазма, оболочка, ядерное вещество; непостоянные — спора, капсула, жгутики, которые при определенных условиях формируются лишь у бактерий отдельных видов, поэтому служат видовым признаком.

С п о р ы. Палочковидные микробы, образующие во внешней среде (почве, воде, кормах, на питательных средах) стойкую форму существования — спору, называются бациллами. При спорообразовании под влиянием неблагоприятных условий в клетке происходят процессы, обуславливающие сгущение цитоплазмы, уменьшение свободной воды (до 40%). Цитоплазматическое содержимое покрывается многослойными оболочками, химический состав которых обеспечивает высокую стойкость споры к нагреванию, высушиванию, действию многих кислот, щелочей, красителей. При законченном спорообразовании спора лежит свободно, без остатков вегетативной клетки; при незаконченном процессе спора, в зависимости от вида микроба, располагается либо в центре клетки, либо на конце (терминально) или между концом и центром клетки (субтерминально) (рис. 12). При микроскопировании препаратов, окрашенных простым методом или по Граму, видна окрашенная вегетативная часть клетки и неокрашенные, хорошо преломляющие свет, споры.

Споры окрашивают специальными методами.

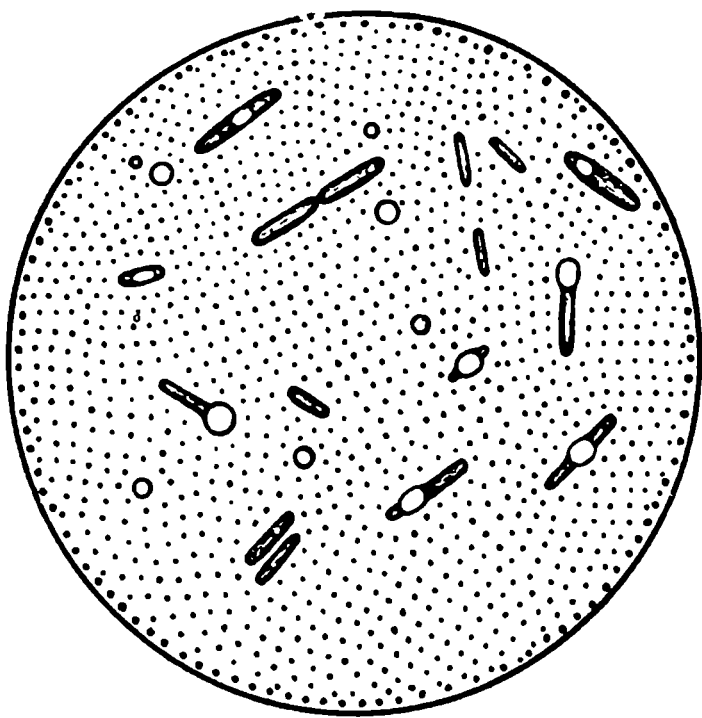


Рис. 12. Бациллярные споры различных типов.

Метод Ауески. Высушенный на воздухе препарат, не фиксируя, протравливают 0,5%-ной соляной кислотой с подогреванием (2—3 мин), охлаждают, промывают водой и фиксируют над пламенем. Затем на препарат кладут листочек фильтровальной бумаги, наливают на него карболовый фуксин Циля, окрашивают с подогреванием до паров 7—8 мин, краску сливают, препарат обрабатывают 5—7 с 5%-ным раствором серной кислоты, хорошо

промывают его водой, дополнительно окрашивают метиленовой синькой 4—5 мин, опять промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют под иммерсией. Вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Мёллера. Фиксированный на пламени препарат протравливают 5%-ной хромовой кислотой 2—3 мин, промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой, далее поступают, как в предыдущем методе. Результат окраски тот же.

Метод Златогорова. Процесс окраски, как в предыдущих двух методах, только без протравы.

Метод Пешкова. Мазок фиксируют, красят метиленовой синькой с подогреванием до кипения, смывают. Докрашивают 10 с 1%-ным водным раствором нейтральрота, смывают, просушивают. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки — в красный.

Спорообразующие виды микробов:

Bac. anthracis, Cl. perfringens, Cl. septicum, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum, Cl. tetani, Cl. botulinum, Amylobacter, Bac. subtilis, Bac. mesentericus, Bac. cereus, Bac. megatherium, Bac. mycoides, Bac. anthracoides, Bac. pseudoanthracis, Cl. sporogenes.

Неспорообразующие виды бактерий:

сем. Enterobacteriaceae (E. coli, Salmonella, Proteus и др.), Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium, Brucella, Pasteurella, Actinobacillus mallei, Erysipelothrix insidiosa, Listeria monocytogenes, Staphylococcus, Streptococcus, Diplococcus, Bact. acidophilus, Serratia marscensis, Francisella tularensis.

Капсула — муцино-подобное вещество, высокомолекулярный полисахарид, является производным наружного слоя оболочки. У патогенных капсулообразующих бактерий наличие капсулы наблюдается только в инфицированном организме как защитное приспособление против фагоцитоза (на искусственных питательных средах капсулы образуются лишь при добавлении кровяной сыворотки или дефибрированной крови). Капсулу отмечают у возбудителя сибирской язвы, газовой гангрены, диплококковой септицемии (рис. 13). Капсульное вещество плохо окрашивается, поэтому для его выявления применяют специальные методы окраски, основанные на явлении метакромазии.

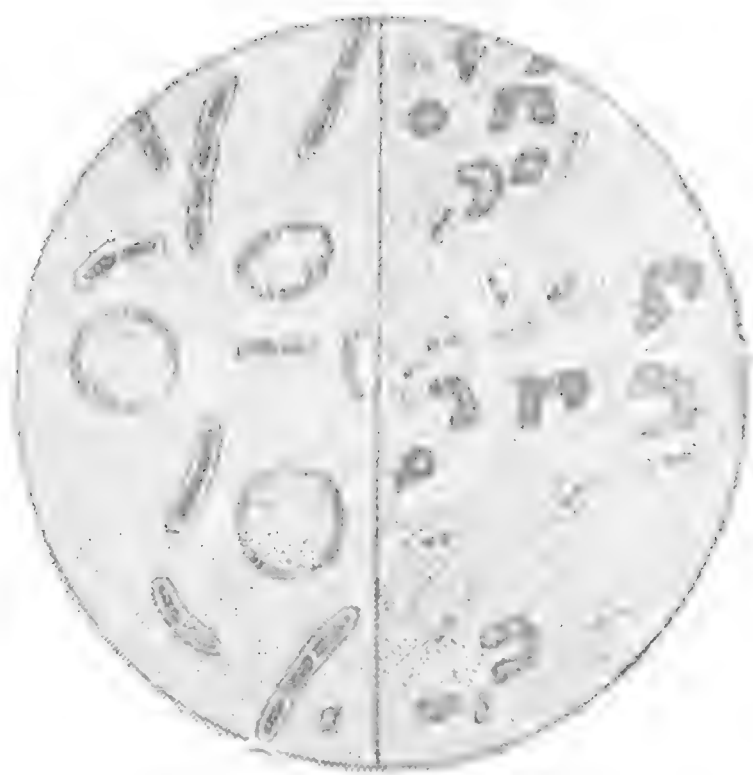


Рис. 13. Капсула у бактерий: а — бацилла сибирской язвы; б — диплококк.

Метод Михина. Фиксированный мазок из крови или препарат-отпечаток из ткани органа (печени, селезенки, почки) окрашивают метиленовой синькой с подогреванием до появления паров, выдерживают 5—7 мин. Краску сливают, быстро промывают водой (можно не промывать), просушивают фильтровальной бумагой. Тело клетки окрасится в синий цвет, капсула — в бледно-розовый.

Метод Романовского — Гимза. Фиксированный препарат окрашивают, как было указано выше: в чашку Петри на стеклянные или деревянные палочки помещают препарат отпечатком (мазком) вниз, под препарат подливают краску, окрашивают 40—50 мин. Результат тот же, что и при окраске по Михину.

Метод Ольта. Свежий водный 2%-ный раствор сафранина наливают на препарат и выдерживают 5—7 мин. Затем слегка промывают водой и высушивают. Вегетативная клетка окрасится в кирпично-красный цвет, капсула — в желто-оранжевый.

Жгутики имеются только у подвижных видов бактерий. Они очень тонкие, обычно их величина за пределами разрешающей способности микроскопа, окрашиваются плохо, поэтому при световой микроскопии к окраске жгути-

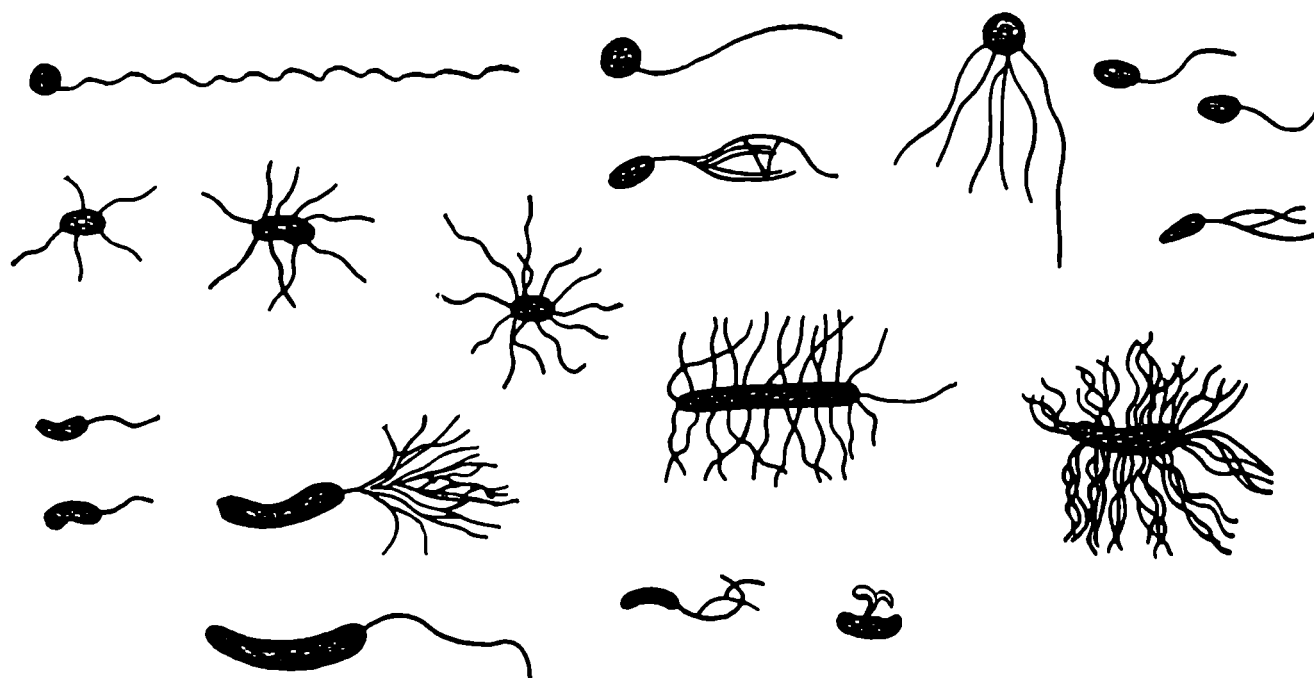


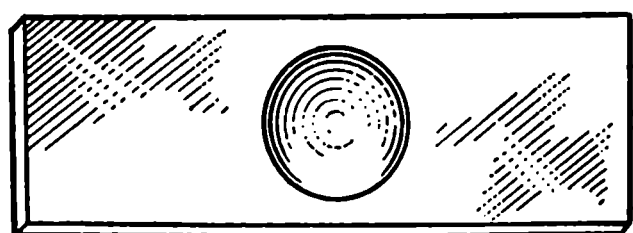
Рис. 14. Разные типы жгутиков.

ков прибегают редко. Чаще бактерий исследуют в живом состоянии (без окраски) и определяют их подвижность. Количество и расположение жгутиков у разных видов различное (рис. 14).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для определения подвижности бактерий применяют метод «висячая капля» и «раздавленная капля».

Метод «висячая капля». Каплю 18—20-часовой бульонной культуры или каплю конденсата агаровой культуры наносят на покровное стекло. Специальным предметным стеклом с углублением («луночкой»), края которого слегка смазывают вазелином, накрывают каплю культуры так, чтобы покровное стекло прилипло к предметному стеклу. Препарат перевертывают покровным стеклом вверх и капля



a



b

Рис. 15. Исследование микробов на подвижность:
a — стекло с луночкой; *b* — «висячая» капля.

«висит» над луночкой (рис. 15). Микроскопируют сухой системой объективов при слегка затемненном поле зрения (пользуются диафрагмой и опущенным конденсором). При малом увеличении находят край капли, затем, приподняв тубус, переводят в рабочее состояние объектив среднего увеличения (40—60), осторожно под контролем глаза (смотреть сбоку) опускают тубус до соприкосновения

фронтальной линзы объектива с покровным стеклом, затем, глядя в окуляр, осторожно поднимают макрометрическим винтом тубус и находят поле зрения, каплю. Затем микрометрическим винтом настраивают микроскоп до оптимальной видимости микробов.

Метод «раздавленная капля». На обычное предметное стекло наносят каплю молодой бактериальной культуры, осторожно накрывают покровным стеклом так, чтобы между стеклами не образовались пузырьки воздуха, а капля культуры не вышла за края покровного стекла. Осторожно опускают объектив среднего увеличения и микроскопируют. В обоих случаях на сероватом фоне поля зрения хорошо заметно движение микробных клеток.

Вопросы для самопроверки. 1. Краски и красящие растворы, применяемые в бактериологии. 2. Методика приготовления микроскопического препарата. 3. Методы окраски препаратов: простые и сложные (специальные). 4. Окраска по Граму, результат окраски; в чем сущность получаемого различного окрашивания? 5. Методы окраски спор. 6. Окраска кислотоустойчивых бактерий; в чем суть метода? 7. Методы окраски капсулы; на чем основаны эти методы? 8. Методы исследования подвижности бактерий.

МОРФОЛОГИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ И ГРИБОВ

Актиномицеты (*Actinomycetes*) характеризуются нитевидным строением разветвленного мицелия без внутренних перегородок (несептированный, одноклеточный). Толщина мицелия не превышает диаметра бактерий (0,5—1,2 мкм), он хорошо воспринимает различные анилиновые красители, по Граму красится положительно. Встречаются актиномицеты и кислотоустойчивые. Специализированных органов плодоношения у них нет. Они размножаются посредством «воздушных спор» — на концах изогнутой гифы мицелия (обычно поднимающейся над поверхностью питательного субстрата) формируются споры. Размножение возможно и фрагментацией (распадом) мицелия на отдельные клетки — оидии (рис. 16).

Гифомицеты — плесневые грибы. Их разделяют на две группы: одноклеточные — фикомицеты (представитель — головчатая плесень из рода *Mucor*) и многоклеточные — микомицеты (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.).

Ф и к о м и ц е т ы (рис. 17) имеют корневидно-разветвленный мицелий. Размножаются бесполым и половым путем. От мицелия отходят особые ответвления — спорангиеносцы, на концах которых формируются головкообразные

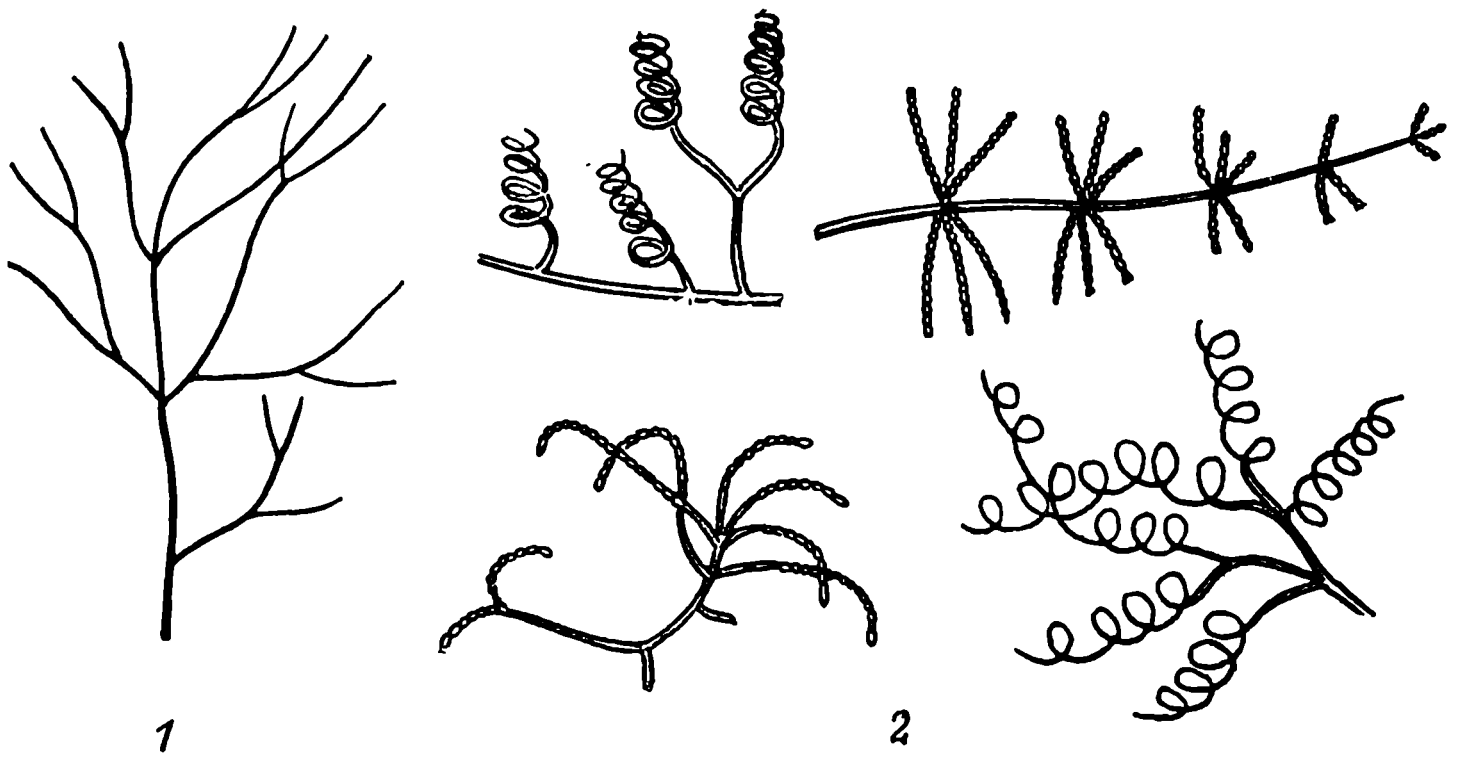


Рис. 16. Актиномицеты:
1 — мицелий; 2 — спораносцы.

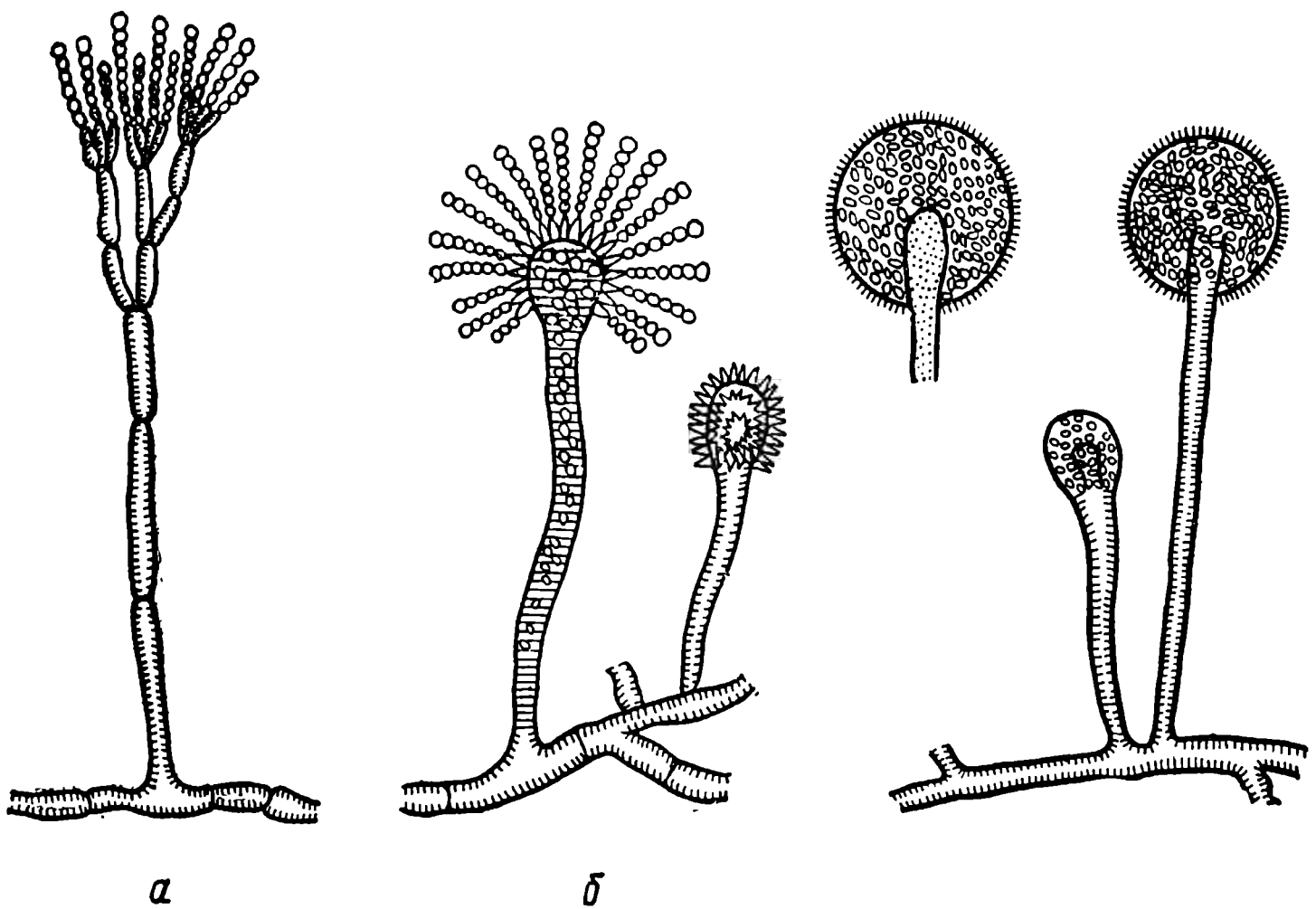


Рис. 17. Плесневые грибы:
гифомицеты — а — *Penicillium*; б — *Aspergillus*; в — *Mucor*.

расширения — спорангии, аски (мешки). У спорангия двухконтурная оболочка, внутри него развиваются споры (аскоспоры). При созревании спорангий разрывается и в окружающую среду выходит огромное количество спор. Помимо размножения конидиеспорами фикомицеты размножаются также путем фрагментации, распада мицелия на оидии и хламидоспоры. На определенных стадиях своего развития, пройдя путь вегетативного размножения, отдельные клетки могут сливаться, образуя зигоспору, из которой затем вновь развивается мицелий.

М и к о м и ц е т ы включают много родов и видов плесневых грибов. У грибов рода *Penicillium* мицелий и конидиеносец септированные (многоклеточные), органы плодотворения в виде кисточки («кистевидная плесень»). Верхняя часть конидиеносца разветвленная, на концах образует стеригмы, от которых отшнуровываются конидиеспоры. Род *Aspergillus* характеризуется септированным мицелием и одноклеточным конидиеносцем, на верхнем его конце веерообразно расположен ряд коротких стеригм. От стеригм отшнуровываются цепочками экзоспоры — конидии («лечная плесень»). Молочная плесень (*Oidium lactis*) — типичный представитель рода *Candida*. Появляется на поверхности молочных продуктов в виде бархатистого пушистого налета. Мицелий септирован, многоклеточный, слабоветвистый. Оидии — споры, отшнуровываются от концевой части мицелия в виде округлых клеток (рис. 18).

Дрожжи (рис. 19) относятся к сумчатым грибам (аскомицеты). Видов дрожжей много. Дрожжи одноклеточные организмы круглой, овальной формы, с двухконтурной оболочкой и дифференцированным ядром. В гомогенной или мелкозернистой цитоплазме дрожжевой клетки обнаруживают 1—2 вакуоли. В цитоплазме имеются нитчатые тельца — хондриосомы, играющие роль в обмене веществ. Размножаются дрожжи почкованием и делением, а некоторые виды — спорами (аскоспорами) и половым путем —

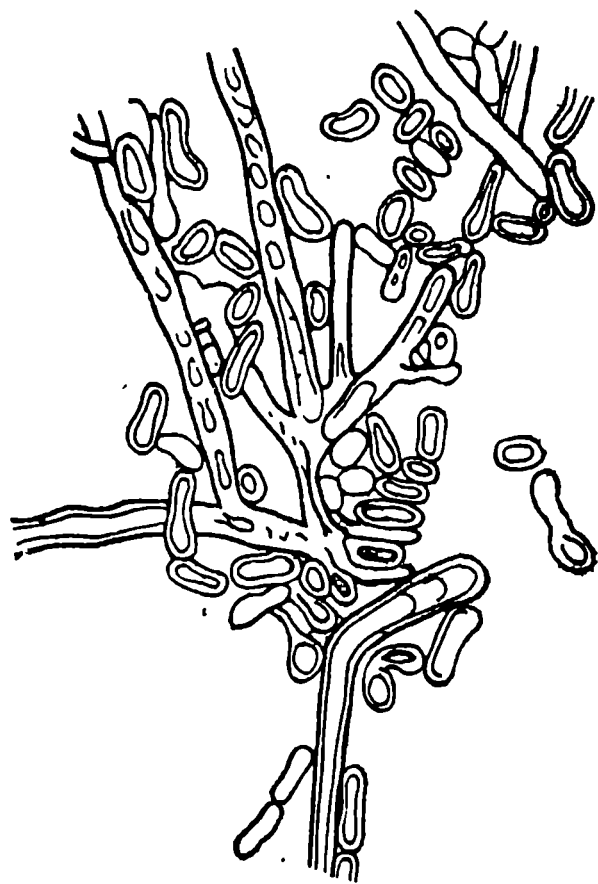


Рис. 18. Молочная плесень (*Oidium lactis*).

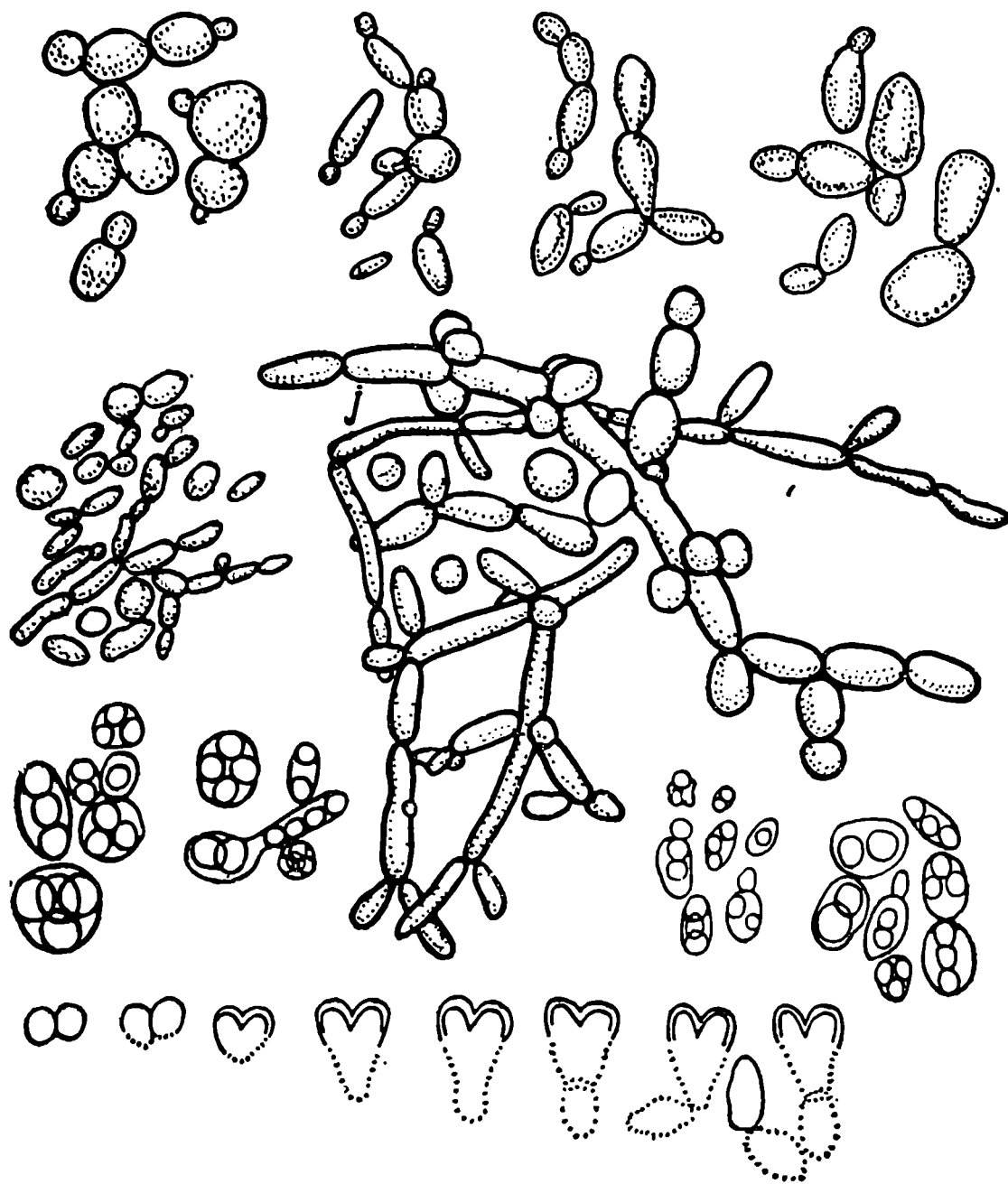


Рис. 19. Дрожжи.

копуляцией двух смежных клеток при помощи небольших отростков. Отдельные виды шизосахаромикетов размножаются простым делением.

Плесневые грибы и дрожжи окрашиваются грамположительно.

Для микроскопического исследования готовят препарат: берут соскоб с поверхности исследуемого материала, эмульгируют его в капле дистиллированной воды, нанесенной на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом с объективом сухой системы. Лучше пользоваться фазово-контрастным микроскопом, что позволяет ясно видеть клеточную структуру грибов. Помимо исследования в натуральном виде, грибы можно и окрашивать по Граму, по Романовскому — Гимза и другими специальными методами.

Вопросы для самопроверки. 1. Подготовка материала и методика микроскопирования грибов. 2. Морфология актиномицетов. 3. Морфологические особенности грибов: мукор, пенициллиум и аспергиллус. 4. Морфологические особенности молочной плесени. 5. Морфологические особенности дрожжевых грибов.

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация (лат. — *sterilis*, бесплодие) — обеспложивание, уничтожение патогенных и непатогенных микроорганизмов, их вегетативных и споровых форм в каком-либо объекте. В лабораториях стерилизуют питательные среды, стеклянную посуду (пробирки, пипетки, колбы и др.), инструменты, перевязочный материал, халаты. Для специальных условий работы стерилизуют воздух и все нужные предметы в боксах. Для стерилизации используют физические, химические или биологические средства в зависимости от стерилизуемого материала. Механизм действия при разных способах стерилизации неодинаковый, в основе каждого из них лежит способность нарушения жизненных процессов микробной клетки: денатурация белков, угнетение функции ферментных систем и др.

В практике применяют полную и неполную стерилизацию. При полной стерилизации уничтожаются вегетативные и споровые формы микроорганизмов, при неполной (частичной) — только вегетативные формы бактерий и вирусы, но с сохранением споровых форм бацилл. При этом обеспечивают условия, предотвращающие развитие спор (резкое охлаждение).

Физические методы стерилизации. С т е р и л и з а ц и я с у х и м ж а р о м. а) *Прокаливанием* на огне, пламени горелки (газовой или спиртовой) стерилизуют бактериологические петли, пастеровские пипетки, стекла, инструменты (пипетки, иглы и др.). б) *Стерилизация сухим нагретым воздухом*, осуществляется в специальном сушильном металлическом шкафу (или печь Пастера) с двойными стенками. Снаружи шкаф облицован теплонепроницаемым материалом. В верхней части у него находится термометр. Между теплонепроницаемой обшивкой и внутренним металлическим шкафом на дне имеется автоматический электронагревательный элемент (рис. 20). Внутри шкафа вставляются металлические сетчатые полочки для размещения стерилизуемого материала. В печи Пастера стерилизуют стеклянную чистую, хорошо промытую, предварительно высушенную посуду. Колбы закрывают ватными пробками, накрывают бумажными колпачками и завязывают. Пробирки, чашки Петри, пипетки пачками завертывают в пергаментную бумагу.

При включении в электросеть воздух внутри шкафа нагревается. По достижении заданной температуры отмечают время начала стерилизации. Режим стерилизации —

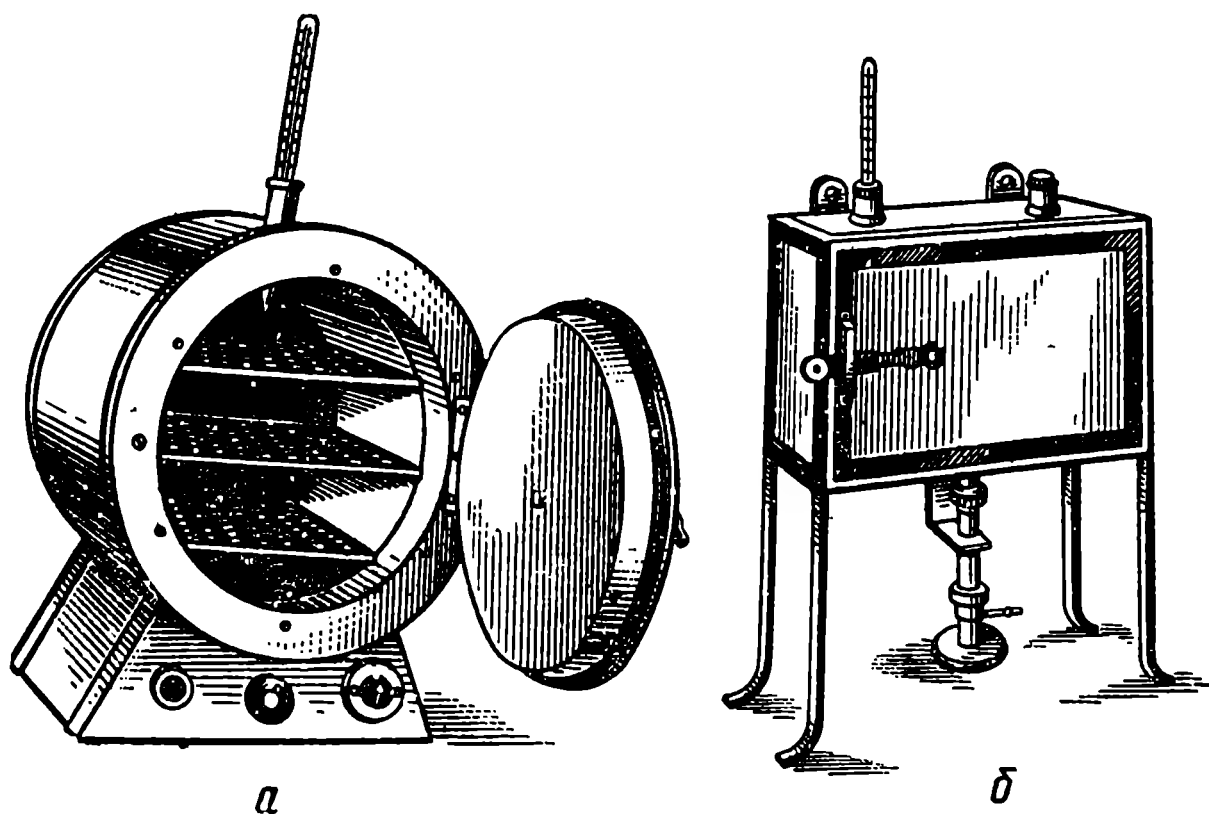


Рис. 20. Сушильные шкафы:
а — электрический круглый; *б* — печь Пастера.

при температуре $155\text{--}160^\circ$, экспозиция 2 ч; при $165\text{--}170^\circ$ — 1—1,5 ч; при 180° — 1 ч. По истечении времени стерилизации нагревание прекращают и ждут, когда температура снизится примерно до 45° , и лишь тогда шкаф открывают.

Воспламеняющиеся вещества, жидкости, питательные среды, резиновые предметы стерилизовать сухим жаром нельзя.

Стерилизация влажным жаром. а) *Кипячение* — простой, доступный способ стерилизации в специальных металлических стерилизаторах (или другой чистой посуде). Кипячением стерилизуют иглы, шприцы, пинцеты, ножницы, скальпели и другие инструменты, резиновые и стеклянные предметы, которые раскладывают в стерилизаторах на металлические решетчатые вставки, покрытые 2—3 слоями марли или тонким слоем гигроскопической ваты. Шприцы стерилизуют в разборном состоянии, в иглы вставляют мандрены; режущие инструменты — лезвия скальпелей, ножниц рекомендуют обертывать марлей или ватой. В стерилизатор наливают воду (желательно дистиллированную), чтобы она полностью покрывала инструменты. Для лучшей стерилизации в воду добавляют 2% двууглекислой соды. Кипятят в течение 20—25 мин. После стерилизации воду осторожно сливают, а инструменты используют только после их охлаждения.

б) *Стерилизацию текущим паром* проводят в аппарате Коха (текучепаровой аппарат), представляющем собой со-

суд цилиндрической формы, сверху неплотно закрытый крышкой с отверстием посередине для термометра (рис. 21). На дне аппарата имеется решетчатая подставка на ножках, до уровня которой наливают воду. На подставку помещают специальное металлическое ведро также с дном в виде решетки. В это ведро ставят стерилизуемые питательные среды в пробирках (или маленьких колбочках). Ведро закрывают неплотно крышкой. При нагревании образующиеся водяные пары, устремляясь вверх, проходят через отверстия в подставке, отверстия в дне ведерка, обволакивают стерилизуемые пробирки со средами и нагревают их. Стерилизуют 30—40 мин. Учитывая, что однократная стерилизация данным способом уничтожает только вегетативные формы бактерий, а споры сохраняются, поэтому стерилизацию текучим паром осуществляют дробно — три дня подряд.

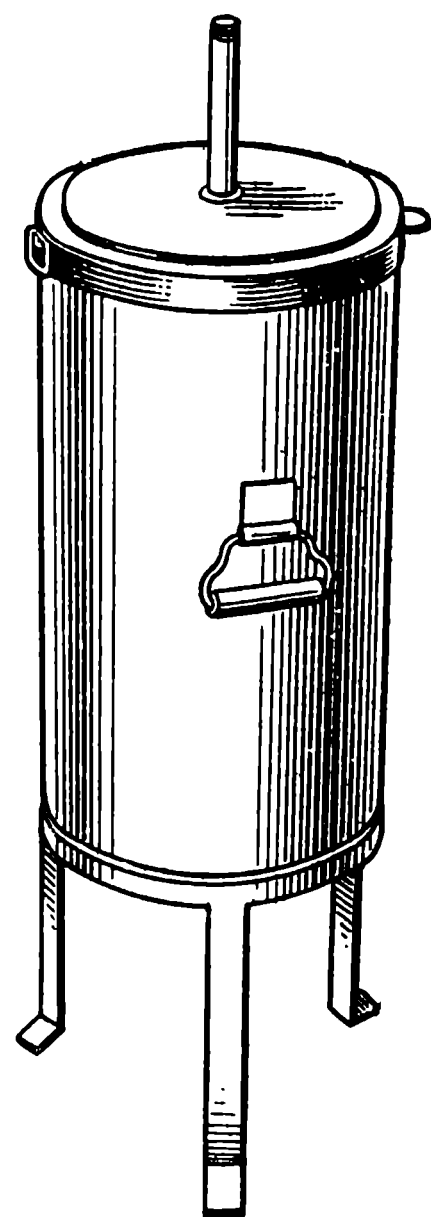


Рис. 21. Текуче-паровой аппарат (аппарат Коха).

После первой стерилизации материал постепенно остывает при комнатной температуре до следующего дня. Если в культурах имелись споры, они «прорастают» в вегетативную форму. На следующий и последующий дни стерилизацию текучим паром повторяют (полная дробная стерилизация). Таким способом часто стерилизуют питательные среды с углеводами, молоко, среды с желатиной, желчью, то есть субстраты, которые не выдерживают нагревания выше 100° , длительного действия пара или сухого жара.

в) *Тиндализация* — дробная стерилизация в водяной бане при температуре $56—58^{\circ}$ в течение 5—6 дней. Первый день прогревают 2 ч, в последующие дни — по 1 ч. Метод был предложен Тиндалем для стерилизации материалов, разрушающихся (денатурирующихся) при нагревании выше $58—60^{\circ}$ (коллоидные растворы, сыворотки крови, асцитная жидкость и другие белоксодержащие вещества).

г) *Пастеризация* — метод неполной стерилизации, предложенный Пастером с целью сохранения питательной ценности пищевого продукта (молоко, мясные, рыбные и овощные консервы), которая снижается при кипячении (разру-

шаются витамины и другие нестойкие к действию высокой температуры вещества). Продукт нагревают при 80° 30 мин, затем резко охлаждают (до $4-8^{\circ}$). На крупных предприятиях (молокозаводах) имеются специальные пастеризаторы с охладительной системой. Пастеризацией достигается частичная стерилизация, так как убиваются вегетативные формы бактерий, а споры сохраняются. Резкое охлаждение препятствует «прорастанию» спор и последующему размножению бактерий.

д) *Стерилизация паром под давлением* (автоклавирование) — самый эффективный метод стерилизации (температура выше 100°). Осуществляют его в специальном аппарате — автоклаве. Принцип стерилизации основан на том, что чистый насыщенный водяной пар при высоком давлении, конденсируясь, повышает температуру внутри котла (автоклава). Уменьшение объема пара после конденсации способствует проникновению его во внутрь стерилизуемого предмета.

Вертикальный автоклав представляет собой цилиндрической формы двустенный металлический котел, сверху закрываемый герметично крышкой. Через специальный кран с воронкой между стенками заливают воду до определенного уровня. Внутренняя стенка котла в верхней части имеет отверстия, в нижней части котла — кран, через который при нагревании воды пар вытесняет воздух из котла автоклава. Сверху на автоклав надевают металлический защитный каркас, причем между ним и самим автоклавом должно быть свободное пространство.

Автоклав нагревают либо электричеством, либо другим нагревательным источником. После загрузки автоклава крышку и кран, через который наливают воду, закрывают, нижний кран временно остается открытым. Нагреваемая вода между стенками автоклава кипит, образующийся пар поднимается вверх и через верхние отверстия внутренней стенки проходит во внутрь котла, толчками вытесняя воздух через нижний открытый кран. Когда воздух весь вытеснится и пар начнет выходить ровной струей, нижний кран закрывают. В результате давление пара внутри автоклава повышается. Началом стерилизации считают момент достижения показания манометра заданной величины. Нагрев регулируют на протяжении всей стерилизации, поддерживая давление на одном уровне. При чрезмерном давлении в автоклаве предусмотрен предохранительный клапан, через который избыток пара выходит наружу. Современные

автоклавы снабжены автоматическим устройством, регулирующим режим работы.

При повышении давления пара соответственно повышается и температура в автоклаве; так, при давлении в 0,5 атм температура будет 110—112°, при 1,0 атм — 120—121°, при 1,5 атм — 124—126°, при 2,0 атм — 132—133°.

Манометры показывают давление пара без учета окружающего атмосферного давления (760 мм рт. ст.). По истечении времени стерилизации автоклав отключают. После охлаждения, при нулевом показании манометра открывают кран для спуска пара. Крышку автоклава подают осторожно на себя, не заглядывая в котел, оберегая лицо от возможного остаточного пара. До полного выхода пара открывать крышку автоклава нельзя, так как при быстром падении давления внутри автоклава стерилизуемые жидкие среды закипают, пробки из пробирок выталкиваются вместе с жидкостью.

В автоклаве стерилизуют питательные среды, выдерживающие нагревание выше 100°, стеклянную посуду, завернутую в бумагу, перевязочный материал, халаты, помещенные в металлические биксы. Кроме того, в автоклаве обеззараживают использованные бактериальные культуры, посуду. В этих случаях давление пара и экспозиция стерилизации продолжительнее (1,5 атм — 1 ч), чем при стерилизации чистого материала (0,5 — 1 атм 30—40 мин). Для проверки качества работы автоклава, соответствия показаний манометра и температуры пара используют различные вещества (бензонафтол, антипирин, сера), имеющие определенную точку плавления. Небольшое количество данного вещества смешивают с таким же количеством краски (фуксин, метиленовая синька), помещают в пробирку, запаивают ее и устанавливают в вертикальном положении между стерилизуемым материалом. При должной темпера-

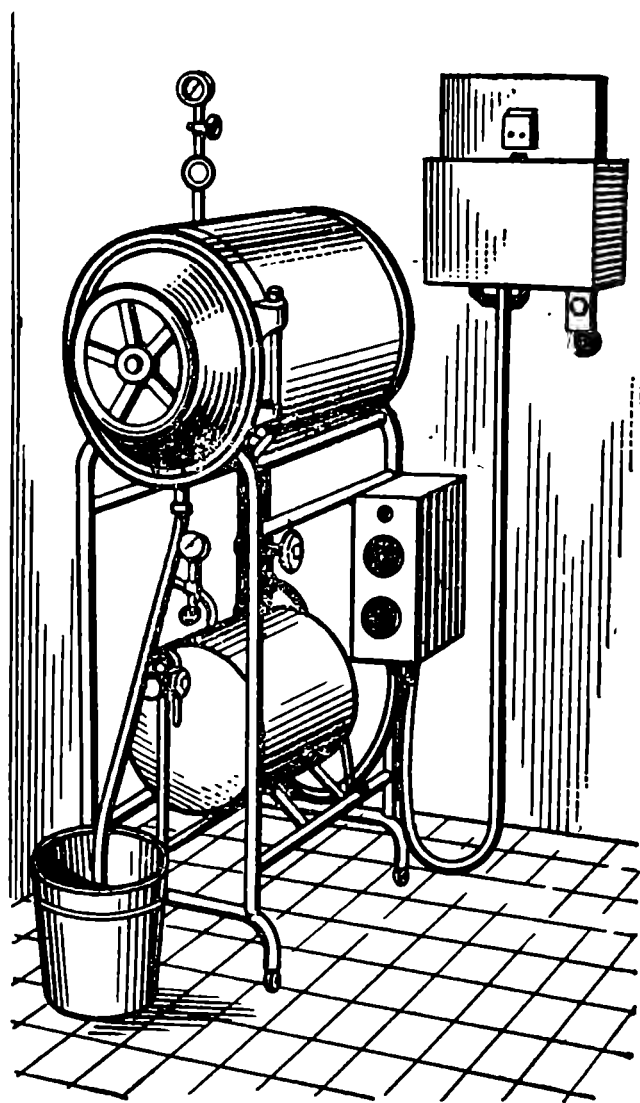


Рис. 22. Современный горизонтальный автоклав.

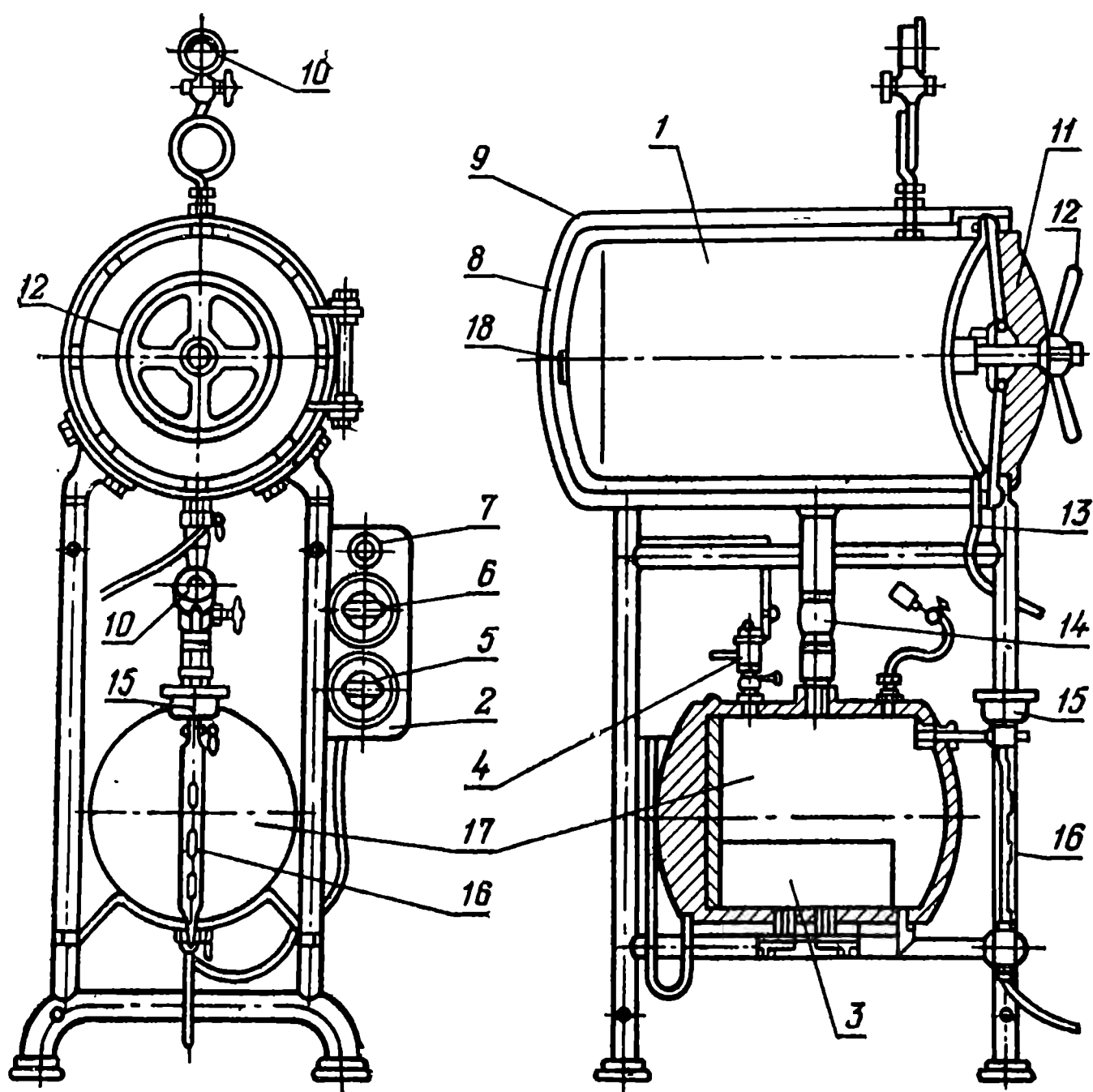


Рис. 23. Схема устройства автоклава:

1 — стерилизационная камера; 2 — электрощит; 3 — нагревательное устройство; 4 — предохранительный клапан; 5, 6 — переключатели; 7 — сигнальная лампа; 8 — паровая камера; 9 — кожух; 10 — манометр; 11 — крышка; 12 — штурвал; 13 — выпускной кран; 14 — патрубок с вентилем; 15 — воронка; 16 — водомерное стекло; 17 — парообразователь; 18 — отверстие для прохождения пара.

туре вещество-индикатор плавится и окрашивается в цвет использованного красителя.

Устройство горизонтальных автоклавов конструктивно отличается от вертикальных, но принцип действия остается таким же (рис. 22 и 23).

С т е р и л и з а ц и я ф и л ь т р о в а н и е м осуществляется пропусканием материала через бактериологические фильтры. Фильтрация связана не только с пропусканием или задержкой фильтром мельчайших частиц (бактерий) в зависимости от величины пор фильтрующей пластинки. В данном процессе имеет также значение адсорбционная способность материала, из которого сделан фильтр. Обычно фильтруют жидкости, не выдерживающие нагревания (сыворотки, растворы антибиотиков и т. п.). При фильтрации учитывают вязкость стерилизуемого материала.

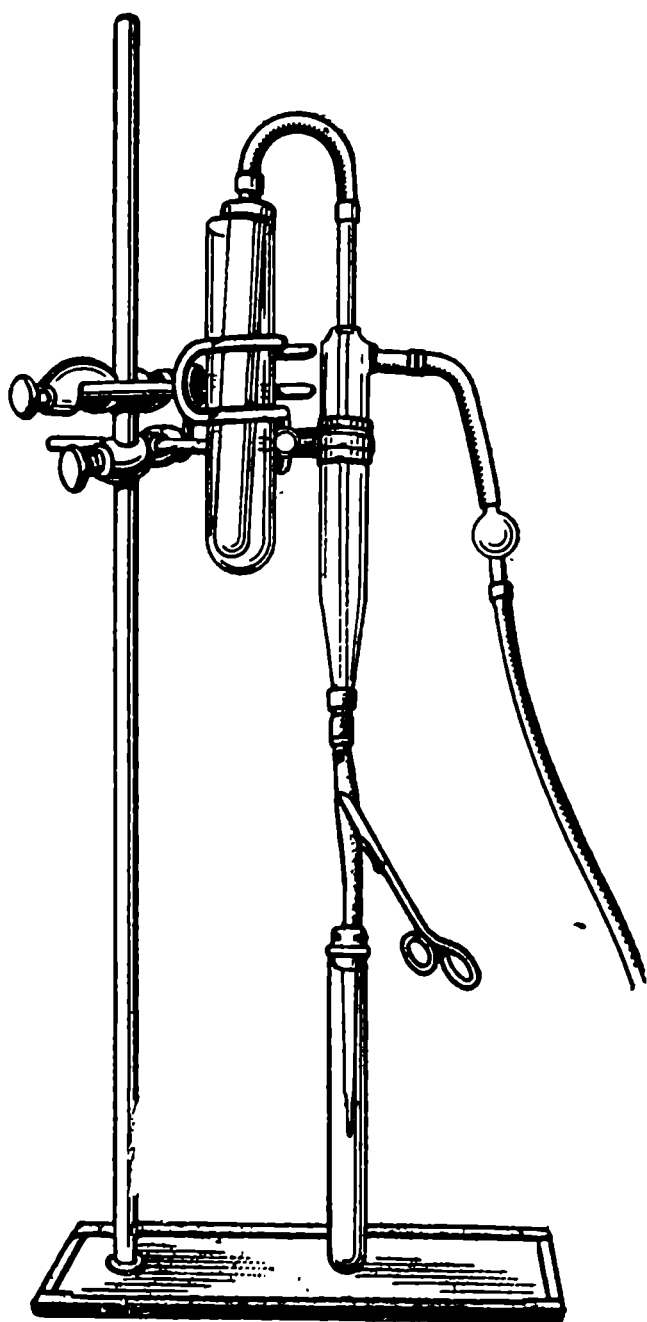


Рис. 24. Смонтированная свеча-фильтр Шамберлана.

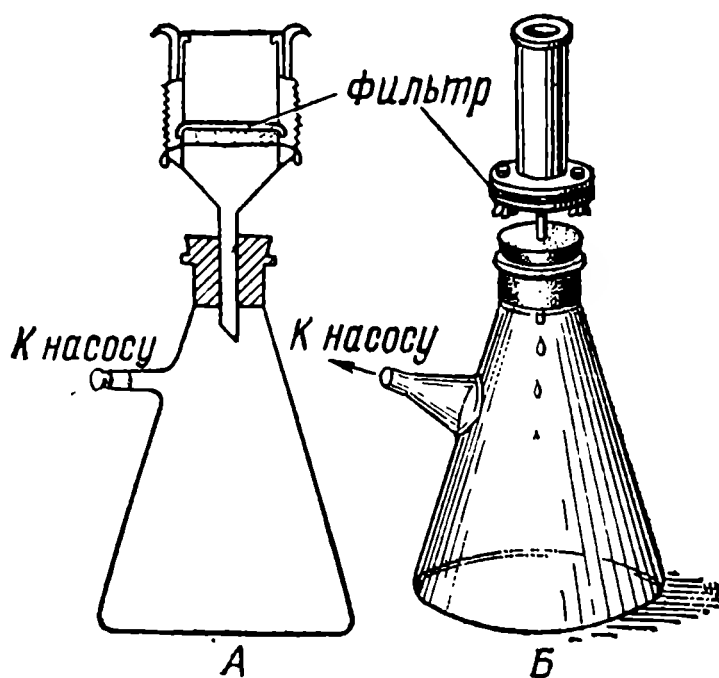


Рис. 25. Смонтированные фильтры Зейтца:

А — со стеклянным и Б — с металлическим держателем.

Фильтры бывают твердые — керамические (цилиндрической формы в виде «свечей», рис. 24), асбестовые (в виде пластинок) и мембранные (с наиболее точной калибровкой пор).

Керамические фильтры (Шамберлана, Беркефельда, отечественного производства) изготавливают из каолина, кварцевого песка. Более широко используют *фильтры Зейтца* — плотные пластины, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. Отечественные асбестовые фильтры обозначаются марками Φ_2 и СФ. Стерилизующими являются фильтры марки СФ (рис. 25).

Мембранные (ультра-) фильтры (коллодийные мембраны) имеют вид тончайших листков белой бумаги. Готовят их из гемицеллюлозы, обработанной соответствующими реактивами, температурой и прессованием. Эти фильтры различают по диаметру и величине пор. Используют их для фильтрации, концентрации частиц, содержащихся в фильтруемой жидкости, а также для определения величины вирусных частиц.

Стерильность полученных фильтратов проверяют посевом на питательные среды с последующим выдерживанием в термостате несколько дней.

С т е р и л и з а ц и я у л ь т р а ф и о л е т о в ы м и л у ч а м и. В лаборатории источником УФ-излучения обычно служат специальные бактерицидные лампы. УФ-облучение используют для обеззараживания воздуха в помещениях (боксах, операционных). Бактерицидные лампы нашли также свое применение в торговле и пищевой промышленности при хранении различных продуктов при температуре выше 0°.

У л ь т р а з в у к при определенной частоте также может быть использован как физический стерилизующий фактор, например, для обеззараживания воды, стерилизации молока, некоторых консервированных продуктов, кожевенного сырья.

Химические методы для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды непригодны. Их чаще используют для консервирования некоторых субстратов, так как они в бактерицидных концентрациях парализуют ферментативную способность бактерий.

В некоторых случаях для стерилизации применяют **биологические методы**.

Вопросы для самопроверки. 1. Что такое стерилизация и каково ее назначение в практической работе врача? 2. Методы стерилизации. 3. Автоклав, его устройство, назначение. 4. Как проверить качество работы автоклава? 5. Что стерилизуют текучим паром? 6. Методы дробной стерилизации. 7. Устройство сушильного шкафа, назначение. Режим его работы. 8. Что нельзя стерилизовать сухим жаром? 9. Фильтры, техника фильтрации, проверка результатов фильтрации.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы, выращенные в лабораторных условиях, называют *микробными культурами*. Для получения культуры из исследуемого материала (кровь, эмульсия тканей, отечная жидкость, гной, молоко и др.) последний высевают на стерильные питательные среды в пробирках, колбах или чашках Петри и помещают на определенное время в специальные шкафы-термостаты, где постоянно поддерживается необходимая температура. Причем оптимальный температурный режим для разных групп микробов неодинаковый (37—38°, 26—30°, 22—25°). В условиях большого объема работы (биофабрики) имеются термостатные комнаты.

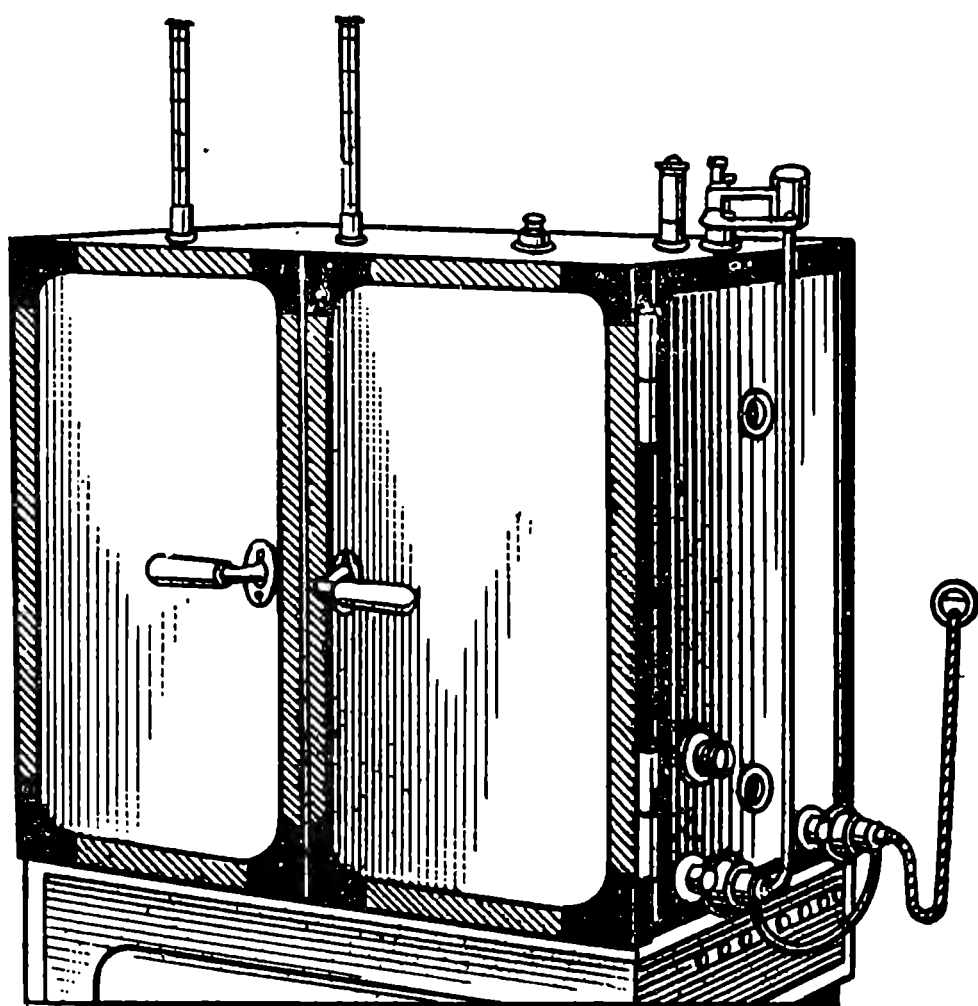


Рис. 26. Термостат.

Лабораторный термостат (рис. 26) представляет собой двустенный шкаф, снаружи покрытый теплоизоляционным материалом (пластиком). Выпускают термостаты «водяные» и суховоздушные. В первом случае между двойными стенками заливают воду (обычно дистиллированную), во втором от нагретой внутренней металлической обшивки нагревается циркулирующий внутри воздух. Нагретые вода или воздух через внутреннюю металлическую стенку передают тепло внутрь шкафа. Подключают термостат к электросети, так как в нижней части его между стенками вмонтированы электрообогреватели. Внутри термостата имеется несколько сетчатых полочек, на которые помещают штативы или специальные корзиночки с пробирками, колбы, чашки Петри, эксикаторы, микроанаэробостаты с посевами. Температура в термостате поддерживается при помощи терморегулятора. При повышении температуры выше нужного уровня терморегулятор автоматически выключает обогреватель, а при понижении температуры включает его. Терморегуляторы могут быть биметаллические, «подушечные» и контактные (ртутные) (рис. 27).

Биметаллический терморегулятор состоит из двух спаянных между собой цинковой и латунной пластинок, изогнутых U-образно. Одна ветвь этой пластинки прикрепляет-

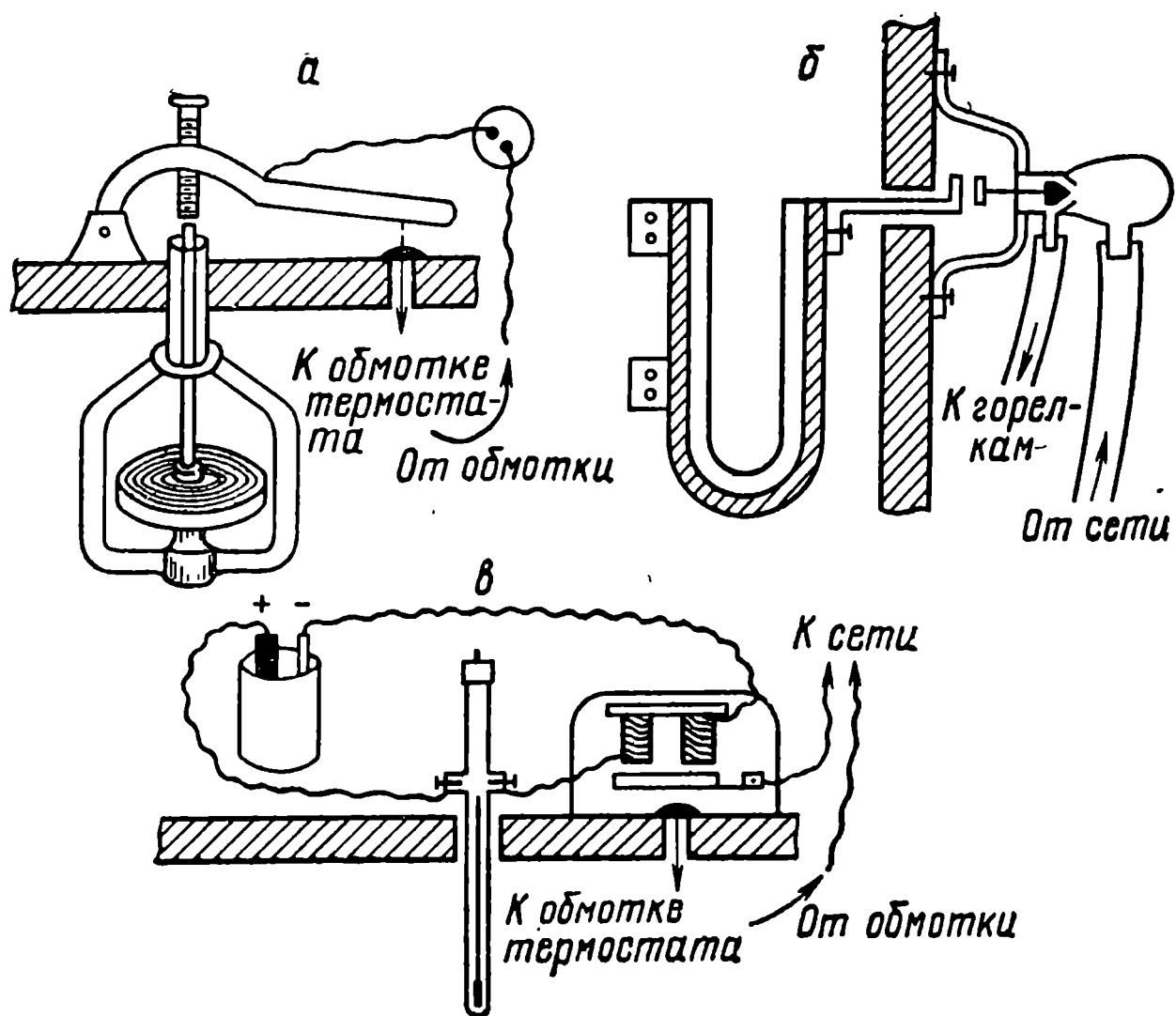


Рис. 27. Терморегуляторы:

а — термостатная подушечка; *б* — биметаллический; *в* — контактный.

ся неподвижно к внутренней стенке термостата, вторая свободная, подвижная, с электроконтактом и находится на очень близком расстоянии от клеммы, соединенной с электросетью. При нагревании термостата, в силу различного коэффициента расширения цинковой и латунной пластинок, подвижная ветвь отклоняется в сторону, выключает обогревание термостата. Температуру в термостате предварительно регулируют установлением клеммы на определенное расстояние от свободной пластинки терморегулятора.

Принцип действия у «*подушечных*» терморегуляторов основан на том, что плоская латунная гофрированная коробочка с запаянной в ней жидкостью укрепляется таким образом со специальным устройством, что при нагревании выше заданной температуры жидкость в коробочке, расширяясь, оказывает давление на ее стенки, происходит отключение из сети. По мере охлаждения термостата жидкость в коробочке тоже охлаждается и не давит на ее стенки («*подушечки*»), поэтому стержень с рычажком, к которому плотно подходит «*подушечка*», включаются в сеть обогрева.

У современных термостатов обычно *контактный терморегулятор* — ртутный термометр с впаянными с двух сто-

рон платиновыми проволоками. Один конец проволоки достигает канала термометра, а другой заканчивается снаружи клеммой. Проволоку впайвают на различном уровне в зависимости от температуры, которую желательно поддерживать в термостате; поэтому для создания различных температур необходимо иметь и различные контактные термометры.

Для культивирования анаэробов и микроаэрофильных бактерий используют эксикатор и анаэроостат (рис. 28).

Эксикатор представляет собой стеклянный сосуд с притертой крышкой. На его дно ставят часовое стекло или открытую чашку Петри с химическими веществами, которые активно связывают кислород воздуха (например, пирогаллол с едким натром). Сверху на специальный вы-

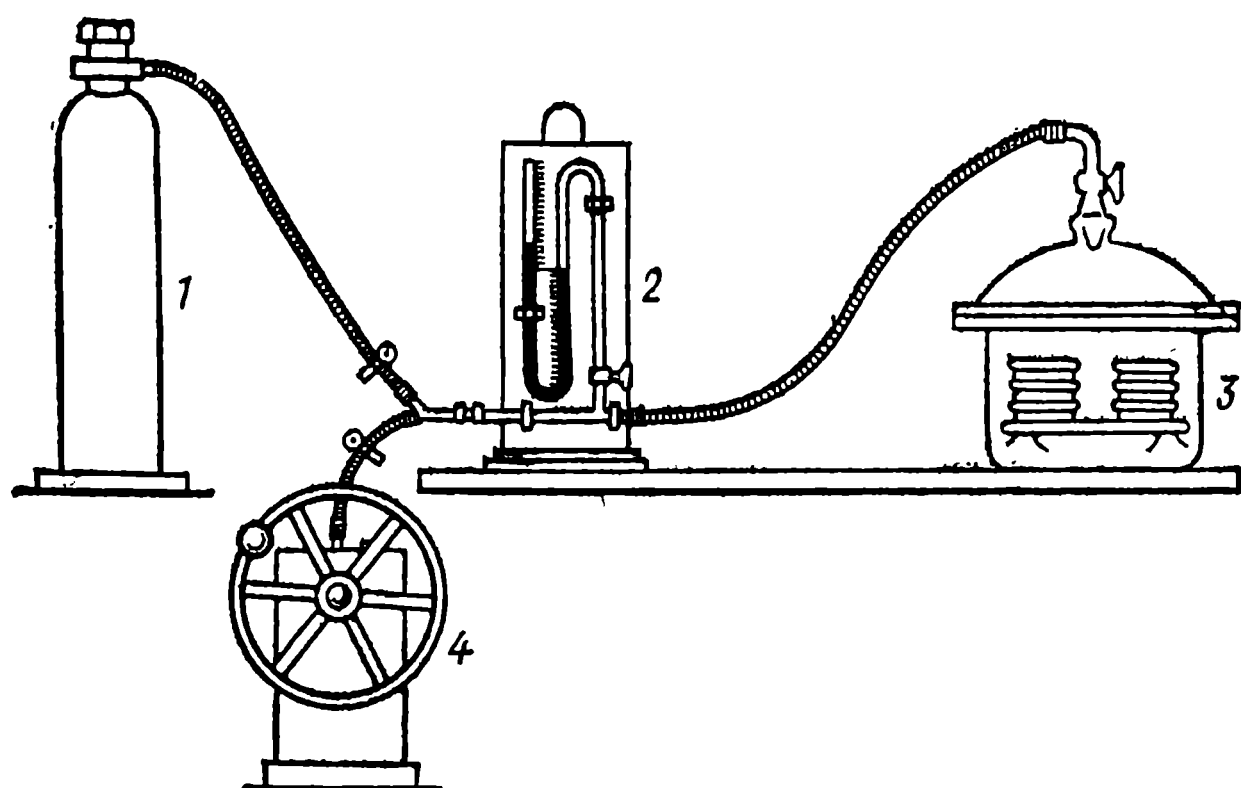


Рис. 28. Установка для культивирования анаэробов:

1 — баллон с инертным газом; 2 — манометр; 3 — вакуум-эксикатор; 4 — насос.

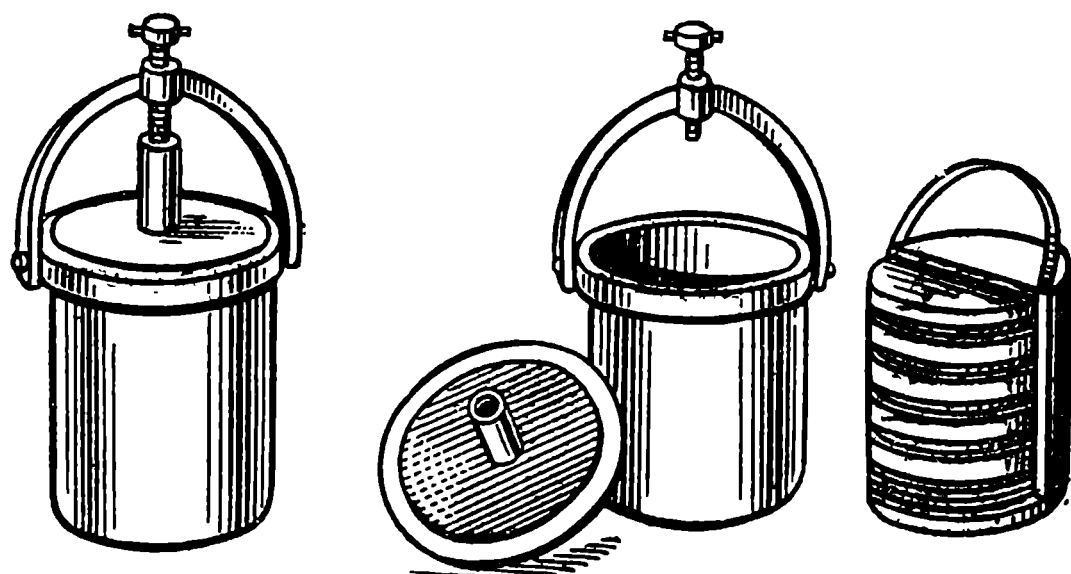


Рис. 29. Анаэроостат.

ступ эксикатора ставят фарфоровую подставку с отверстиями, а на нее пробирки или чашки с посевами и плотно закрывают крышку; для герметичности края эксикатора смазывают вазелином, затем эксикатор помещают в термостат.

А н а э р о с т а т (рис. 29) — металлический, герметически закрывающийся цилиндрический сосуд, снабженный кранами для удаления воздуха или подачи нужного для работы газа (CO_2 , N_2 , O_2 и др.) и вакуум-манометром. Посевы помещают внутрь цилиндра, закрывают крышкой и с помощью насоса из анаэроstats удаляют воздух. Степень разрежения внутри прибора показывает вакуум-манометр в миллиметрах ртутного столба (от 0 до 760). Анаэроstats с посевами также ставят в термостат.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. ТЕХНИКА ПОСЕВА МИКРОБОВ

Необходимость культивирования микробов связана не только с целью выделения возбудителя болезни из исследуемого материала и определения его вида, но и для накопления микробной массы при изготовлении биологических препаратов: вакцин, антигенов и аллергенов. Для культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях применяют различные искусственные питательные среды.

Питательные среды бывают: по консистенции — жидкие, плотные, полужидкие; по происхождению — животного, растительного происхождения и синтетические среды постоянного состава; по назначению — обычные, или простые, для выращивания большинства микроорганизмов; специальные — для культивирования микробов, не растущих или плохо растущих на обычных питательных средах; дифференциально-диагностические — употребляемые для определения родовых или видовых особенностей исследуемых бактериальных культур (гемолитических, сахаролитических, протеолитических, редуцирующих и других свойств); селективные — для выделения микробов одного рода или вида из материала, содержащего смесь разных видов микроорганизмов, на которых одни виды хорошо растут, а другие не растут; среды обогащения (накопительные).

Основой многих питательных сред животного происхождения является *мясная вода*. Ее готовят из свежего нежирного говяжьего мяса, освобожденного от костей, фасций, сухожилий. Измельченное мясо (мелкие кусочки или фарш) заливают дистиллированной водой в соотношении 1 : 2 (на 1 кг мяса 2 л воды). Экстрагируют 12—24 ч, кипятят 1,5—

2 ч, фильтруют, добавляют дистиллированной воды до первоначального объема, разливают в бутылки, колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве.

Обычные (простые) среды. Мясо-пептонный бульон (МПБ) — жидкая питательная среда. Для его приготовления к 1 л мясной воды добавляют 1% пептона, 0,5% химически чистой поваренной соли и кипятят. Мясная вода слабокислой реакции, поэтому МПБ подщелачивают — добавляют небольшое количество 10—15%-ного раствора КОН или NaOH, кипятят 2—3 мин, проверяют pH при помощи компаратора Михаэлиса (рис. 30) или электропотенциометром. Мясо-пептонный бульон фильтруют через бумажный фильтр, разливают по пробиркам, автоклавируют.

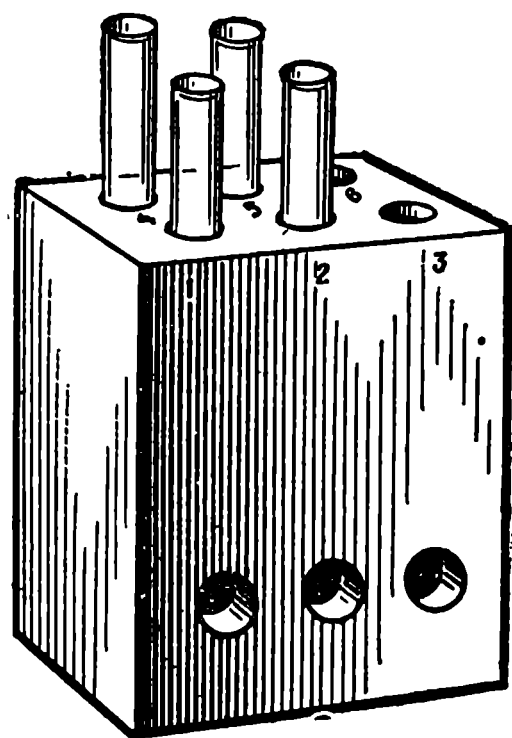


Рис. 30. Компаратор для определения pH среды.

Мясо-пептонный агар (МПА) — плотная питательная среда. К МПБ добавляют 2% агар-агара (безазотистое органическое вещество, полученное из морских водорослей) и кипятят до его расплавления, в горячем виде устанавливают pH, кипятят 5—10 мин, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки или колбочки, автоклавируют. После стерилизации горячие пробирки с агаром раскладывают наклонно под углом 5—6°. При застывании образуется скошенная плотная поверхность.

Мясо-пептонный полужидкий агар готовят так же, как и МПА; различие заключается в том, что агар-агара добавляют меньше — 0,15—0,20—0,25%.

Специальные питательные среды. Бульон Мартена. Свиные желудки (или сычуги рогатого скота) очищают от жира, фасций, измельчают в мясорубке, заливают водой 1 : 4 и добавляют 1% (к объему жидкости) соляной кислоты. Смесь выдерживают при 50° 24 ч, нейтрализуют 20%-ным раствором NaOH до щелочной реакции по лакмусу, автоклавируют при 120° 15 мин. Для приготовления бульона смешивают равные количества мясной воды и полученной смеси, кипятят 10 мин, подщелачивают 20%-ным раствором NaOH до pH 7,9, кипятят 30 мин, фильтруют,

разливают в пробирки, автоклавируют при 0,5 атм (110°) 30 мин.

Добавление 2% агара обеспечивает получение плотной среды — а г а р М а р т е н а.

Б у л ь о н Х о т т и н г е р а готовят из триптического гидролизата (перевара) мясных отходов — фасций, жира, сухожилий. 1 кг мясных обрезков заливают 2 л кипящей воды, кипятят 5 мин, охлаждают до 45° и добавляют 5,0—10,0 панкреатина, подщелачивают до рН 7,8—8,0 углекислым натром, встряхивают и доливают хлороформ (10 мл на 1 л), плотно закрывают, выдерживают в теплом месте 10 дней, ежедневно встряхивая. Полученный перевар подкисляют соляной кислотой до рН 5,5. Хранят в темном месте. Для приготовления питательной среды к 1 л воды добавляют 100—200 мл полученного перевара, кипятят 1—2 мин, фильтруют, подщелачивают, стерилизуют. Агар Хоттингера готовят так же, как и обычный МПА.

С а х а р н ы й (г л ю к о з н ы й) б у л ь о н (и л и а г а р) изготавливают как обычные среды, но к ним добавляют 1—2% глюкозы и стерилизуют текучим паром или автоклавируют при 0,5 атм.

М я с о - п е п т о н н а я ж е л а т и н а. К МПБ добавляют 10—20% желатины (продукт, получаемый из клейдающих тканей животных), расплавляют и в горячем виде устанавливают нужную реакцию среды, пропускают через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки, стерилизуют текучим паром дробно.

М я с о - п е п т о н н ы й п е ч е н о ч н ы й б у л ь о н К и т т — Т а р о ц ц и — жидкая среда для культивирования анаэробов. Печень крупного рогатого скота нарезают мелкими кусочками, заливают водой 1 : 1, кипятят, фильтруют и печеночную воду добавляют к МПБ 2 : 1 (на 2 л МПБ 1 л печеночного отвара), кипятят, устанавливают рН, разливают по пробиркам высоким столбиком, в которые предварительно положены кусочки вареной печени. В пробирки поверх среды наливают 1—2 мл вазелинового масла и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм 30 мин.

С ы в о р о т ч н ы й б у л ь о н и с ы в о р о т ч н ы й м я с о - п е п т о н н ы й а г а р готовят путем асептического добавления к МПБ или расплавленному и охлажденному до 45—50° МПА 5—10% стерильной сыворотки крови лошади (или барана, кролика), затем сывороточный бульон разливают в стерильные пробирки (колбы).

Сывороточный МПА разливают или в пробирки (столбиком) или в чашки Петри.

Дифференциально-диагностические среды. К р о в я н о й М П А применяют для выявления гемолитических свойств бактерий. Предварительно в стерильную колбочку со стеклянными бусами асептично берут кровь (у барана, лошади или кролика), встряхивают 15—20 мин, чтобы фибрин отделить от остальной массы крови. Фибрин сгустками осаждается на бусах и дефибрированную кровь (5—10%) стерильно добавляют к расплавленному и остуженному МПА, легким вращением колбочки равномерно смешивают и разливают в стерильные чашки Петри.

Среды Гисса. В пептонную воду (состоящую из дистиллированной воды, 0,5% NaCl и 1% пептона) добавляют 0,5% углевода (сахар или многоатомный спирт) и 0,5% индикатора Андрэдэ. Обычно готовят набор сред с разными углеводами, каждый в отдельности. Используемый индикатор представляет собой 0,5 г кислого фуксина, 16 мл 4%-ного раствора NaOH, 100 мл дистиллированной воды. Среды с углеводами разливают в пробирки с «газовками» (поплавками), опущенными в пробирки вверх дном. Стерилизуют среды с углеводами текучим паром дробно. Среды Гисса могут быть жидкие и полужидкие (без газовок), содержащие 0,25% агара. При ферментации того или иного углевода микробом, растущим в данной среде, образуется кислота, под действием которой восстанавливается цвет краски индикатора. Среда приобретает красный цвет. Образовавшиеся при ферментации углевода газообразные продукты скапливаются в поплавках.

Среда Эндо. В расплавленный МПА (рН 7,4—7,6) вносят 0,5—1% лактозы и 0,5% насыщенного спиртового раствора основного фуксина, обесцвеченного добавлением по каплям 10%-ного сернокислого натрия. Среду кипятят и разливают в чашки Петри. Бактерии, сбраживающие лактозу, на этой среде растут в виде красных колоний.

Среда Левина. Готовят 2%-ный агар на бульоне Хоттингера, рН 7,2—7,4, стерилизуют в автоклаве. К 100 мл готового расплавленного агара добавляют: 2 мл 0,5%-ного раствора метиленовой синьки, 1,5 мл 2%-ного эозина (щелочного бактериологического), 2 г лактозы и 0,2 г двуосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4). Растворы красителей готовят на дистиллированной воде и стерилизуют в аппарате Коха. Раствор метиленовой синьки перед

употреблением подогревают на водяной бане и добавляют к агару в теплом виде. После добавления этих компонентов среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Среда фиолетового цвета.

В и с м у т - с у л ь ф и т а г а р (среда Вильсон — Блера). МПА (рН 7,5) с индикатором, содержащим лимоннокислый висмут, сернокислый натрий, соль Мора (серноаммонийная соль железа), двуосновной фосфорнокислый натрий, глюкозу и бриллиантовую зелень. В настоящее время висмут-сульфит агар (как и агар Эндо, среду Плоскирева) промышленность выпускает в сухом порошкообразном виде. 6 г сухого порошка растворяют в 100 мл дистиллированной воды, подогревают при непрерывном помешивании, разливают в стерильные пробирки и оставляют в наклонном положении. Применяют также среды с химическими веществами, которые изменяют окраску в результате окислительно-восстановительных (редуцирующих) процессов, обусловленных ферментами бактерий. Для этого готовят молоко с метиленовой синькой. Свежее обезжиренное коровье молоко подщелачивают двууглекислым натром до слабощелочной реакции по лакмусовой бумажке, добавляют 1%-ный водный раствор метиленовой синьки до голубого окрашивания. Стерилизуют текучим паром дробно.

Если есть предположение, что в исследуемом материале имеется небольшое количество бактерий, то рекомендуют использовать **среды накопления** (обогащения). **Среда Шустовой**: к МПА (рН 7,4) добавляют 10% 50%-ного водного раствора гипосульфита и 2% раствора Люголя. Применяют для накопления бактерий паратифа. **Среда Раппопорт**: к МПБ добавляют 1% глюкозы, 10% желчи и 1% индикатора Андрэде. Стерилизуют текучим паром.

Синтетические среды применяют для изучения метаболизма бактерий и других биологических особенностей. Их составляют из химически чистых растворимых в воде веществ, в строго определенных количествах: фосфорнокислого аммония, фосфорнокислого калия, хлористого натра, сернокислого магния, глюкозы или другого углевода, никотиамида и др. По мере необходимости готовят плотные синтетические среды путем добавления агара. Стерилизуют в автоклаве. (Синтетические среды Моделя, Соттона — см. подраздел «Культивирование микобактерий туберкулеза».)

Для культивирования дрожжей и плесневых грибов используют следующие среды.

Синтетическая среда Ван-Итерсона: азотнокислого аммония (NaH_4NO_3) 0,5, калия фосфорнокислого одноосновного (KH_2PO_4) 0,5, воды водопроводной 1 л. Автоклавируют при 1 атм 20 мин.

Глюкозный агар Сабуро: глюкозы 4,0, пептона 1,0, агара 1,8, воды 100 мл. Стерилизуют автоклавированием.

Агар Литмана с бычьей желчью: пептона 10,0, глюкозы 10,0, обезвоженной бычьей желчи 15 мл, кристаллвиолета 0,01, воды 1 л, агара 20,0. Стерилизуют в автоклаве при 1 атм 15 мин. Разливают в чашки толстым слоем, чтобы предупредить обезвоживание среды.

Техника посевов микробов. Для получения бактериальных культур из молока, масла, сена, силоса, воды, гноя, тканей органов погибших животных делают посев на стерильные питательные среды обязательно вблизи горячей газовой или спиртовой горелки, чтобы во время посева избежать бактериального загрязнения извне. Посев производят петлей или пастеровской пипеткой (рис. 31). Поступающий в лабораторию для исследования материал регистрируют в специальном журнале. На пробирках (чашках Петри, колбах) пишут номер экспертизы.

При посеве в жидкие среды (молоко, МПБ) в левой руке держат пробирку в таком же положении, как и при изготовлении препарата-мазка; в правой руке находится петля (или пипетка) с засеваемым материалом и пробка пробирки. Около пламени горелки петлю с каплей материала (или пипетку) вносят в пробирку со средой, слегка погружая в нее. Закрыв пробирку пробкой, петлю прожигают на огне, а пастеровскую пипетку опускают в банку с дезраствором (карболовой кислотой, лизолом, формалином и др.). Во время работы следят, чтобы среда не касалась пробки и не вылилась. Засеянные питательные среды помещают в термостат.

При посеве на плотную среду пробирки с засеваемой (пересеваемой) культурой и со стерильной питательной средой (МПА) берут в наклонном положении (скошенная поверхность агара сверху) в левую руку, пробками в сторону пламени горелки. В открытую у пламени пробирку с культурой (или другим материалом) осторожно опускают петлю, слегка прикасаясь ею поверхности исследуемого материала, и, взяв небольшое количество (одну каплю), переносят его в другую пробирку со стерильной средой. Петлю опускают до дна пробирки, по-

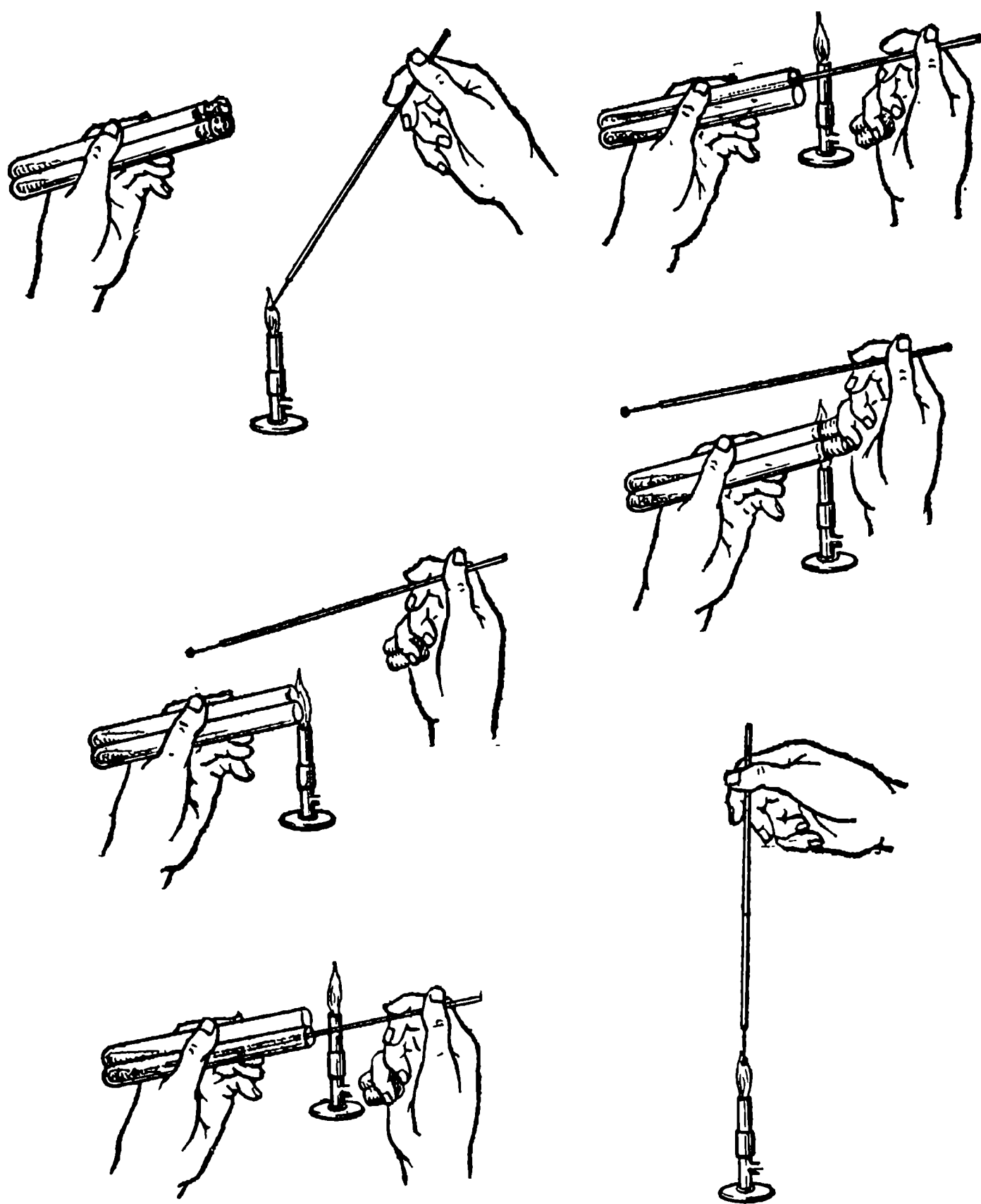


Рис. 31. Пересев из одной пробирки в другую.

гружают в конденсационную жидкость и зигзагообразными движениями петель проводят вверх по скошенной поверхности агаровой среды. Посевы (пробирки) ставят в термостат для культивирования. Через 16—18, 24—48 ч учитывают результат и изучают культуральные свойства бактерий.

В *жидкой среде* рост микроорганизмов проявляется либо равномерным помутнением за счет увеличения числа бактериальных клеток, либо образующимся осадком (в этом случае среда остается прозрачной). Осадок может быть рыхлый, легко разбивающийся при встряхивании пробирки, или слизистый, поднимающийся в виде «косички», «смер-

чика», а также в виде сплошной массы на дне пробирки (колбы) или мелких крупинок, располагающихся на стекле пробирки. Есть виды микроорганизмов, которые в силу особой потребности в кислороде воздуха растут на поверхности жидкой среды, образуя пленку и не вызывая помутнения бульона. Пленка может быть сухой и слизистой, гладкой и складчатой. В ряде случаев бактериальные культуры дают одновременно помутнение среды, обильный осадок и пристеночное кольцо на поверхности.

На *плотной среде* культуральные свойства определяют по характеру развивающихся колоний. При внесении на поверхность среды большого количества бактериальных клеток наблюдают сплошной рост микробной массы. При высеве небольшого количества клеток на среду с большой поверхностью из каждой бактериальной клетки в результате ее деления (размножения) формируется колония.

Колонии в диаметре могут быть мелкие (1—2 мм), крупные (более 2 мм) или совсем маленькие в виде мельчайших росинок. Различают колонии сухие, влажные (сочные) или слизистые; гладкие, глянцевые, шероховатые с неровной поверхностью, с ровными или неровными краями, выпуклые, плоские и с углублением посередине, прозрачные и матовые, бесцветные или пигментированные. Колонии многих видов бактерий, актиномицетов, плесневых грибов, дрожжей при росте на различных питательных субстратах могут принимать различную окраску, обусловленную выделением красящих веществ — **п и г м е н т о в**. (Если пигменты растворимые, окрашивается вся среда, а если нерастворимые, тогда окрашивается только микробная масса колоний.) Для различных видов микроорганизмов характерно образование пигмента определенного цвета — синезеленого, золотистого, белого, кремового, лимонно-желтого, пурпурно-красного и др. Пигментообразование лучше определять на плотных средах (картофель, молочный агар и др.). Для данного процесса имеет значение температурный уровень; при культивировании у многих он в пределах 25—30°. Определенное влияние оказывают также доступ кислорода воздуха и рассеянный свет.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

Чистой культурой называют микроорганизмы одного вида, выросшие на питательной среде. Часто употребляемое название *разновидность* относится к микроорганизмам

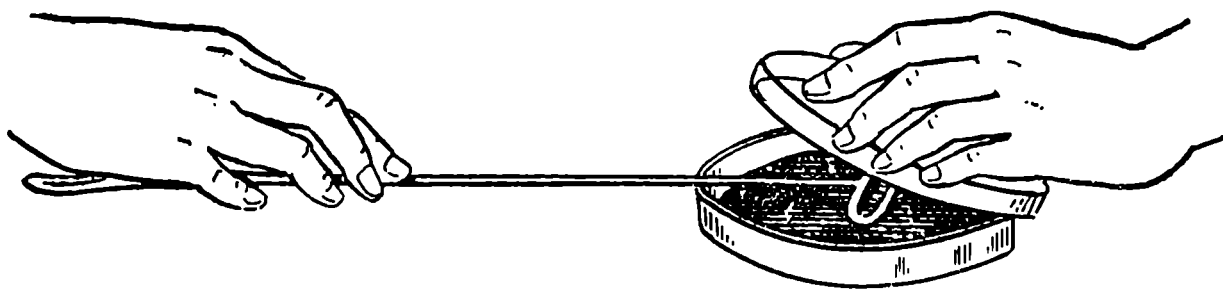


Рис. 32. Посев на плотную среду в чашке Петри.

определенного вида, но отличающегося от последнего каким-либо одним признаком. Под названием *штамм* следует понимать культуру одного вида микробов, выделенную из конкретного источника (из органов животного, из корма, пробы почвы, воды и других объектов). *Клон* — линия культуры микробов, происходящих из одной клетки.

Для выделения чистой культуры существует несколько методов.

Метод Дригальского. Берут несколько чашек Петри со стерильным МПА, в одну из них на поверхность агара наносят каплю смеси бактерий. Специальным шпателем или пастеровской пипеткой, изогнутой на огне горелки в виде шпателя (рис. 32), растирают каплю по поверхности агара, закрывают крышкой чашку. Этим же шпателем растирают по поверхности другой чашки, затем третьей, четвертой и т. д. Чашки помещают в термостат, перевернув вверх дном, чтобы образующийся конденсат не смывал культуру. Самый густой рост будет в первой чашке, в последней чашке обычно получают изолированные друг от друга колонии. Колонии изучают по их внешнему виду, из них готовят бактериологический препарат, окрашивают и микроскопируют. Отобрав колонию с характерными признаками и соответствующими морфологическими, тинкториальными свойствами для искомого вида возбудителя, из нее бактериологической петлей производят посев в пробирки с МПБ и МПА (отвивка, пересев колонии) для получения чистой культуры одного вида микробов.

Для выделения чистой культуры бактерий часто пользуются методом, основанным на использовании неодинакового действия химических веществ, антибиотиков, добавленных к питательным средам, на развитие разных видов микробов. Эти вещества, угнетая рост одних видов, не влияют на рост других. На этом принципе основано применение многих селективных сред с красками: яично-крахмальные среды для выделения микобактерий туберкулеза,

глюкозо-печеночная среда с генцианвиолетом (или кристаллвиолетом) для получения роста бруцелл и подавления роста других видов микроорганизмов.

При исследовании воды, молока, фекалий и других материалов используют методы, предложенные Пастером и Кохом.

Метод Пастера основан на последовательном разведении в 10 пробирках с жидкой средой капли смеси бактерий, с расчетом получить в последней пробирке чистую культуру. Кох, введя в лабораторную практику использование плотных сред, применил принцип Пастера, но разведения производил в плотной расплавленной среде и содержимое каждой пробирки с разным количеством исследуемого материала выливал в отдельную чашку Петри. После выдерживания в термостате в последних чашках с наибольшим разведением обнаруживают изолированные колонии (рис. 33). Пересеяв отдельную колонию в среды в пробирках, культивируя в термостате, получают чистую культуру.

При выделении спорообразующих микроорганизмов, учитывая стойкость спор при нагревании, исследуемый материал (или смесь выросших разных культур) прогревают в водяной бане при 80° — 30 мин, при этом все вегетативные формы погибают, а споры сохраняются. После прогрева производят пластинчатый посев по Дригальскому с последующей отливкой колонии. Помимо этого метода при выделении культуры спорообразующего патогенного вида микроба прибегают к биопробе: после прогрева смеси микробов ее вводят подкожно лабораторному животному (белая мышь, морская свинка); через 1—3 суток животное гибнет. Труп животного вскрывают и из разных внутренних органов пастеровской пипеткой производят посев на питательные среды для получения чистой культуры возбудителя.

Нередко для выделения чистой культуры подвижных видов бактерий пользуются методом Мечникова и Шукее-

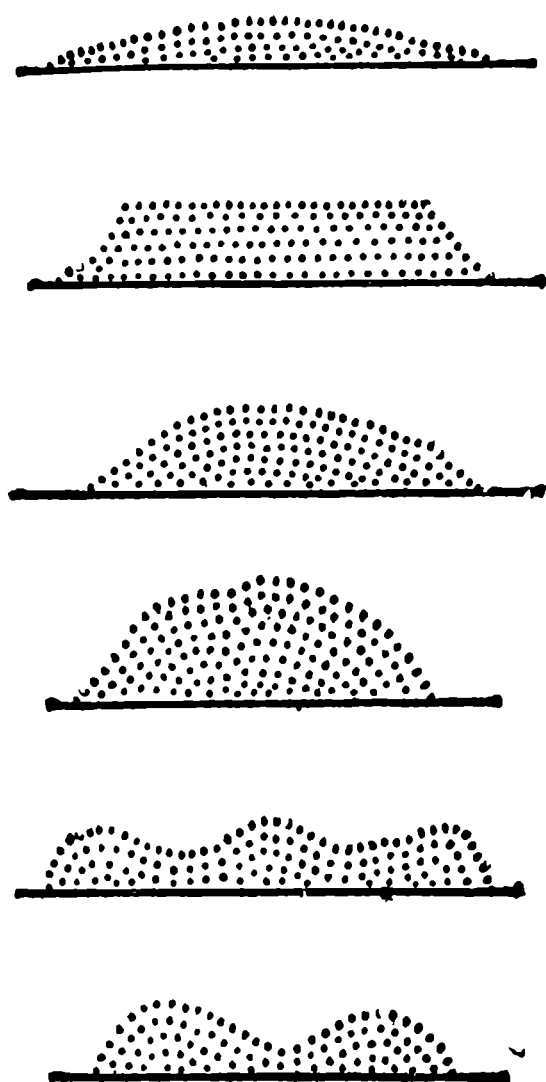


Рис. 33. Колонии различного строения (в разрезе).

вича. Каплю исследуемого материала помещают на дно пробирки со скошенным агаром (обязательно в конденсационную воду).

Если в смеси с разными бактериями будет находиться нужный подвижный вид микроба (протей, столбнячная палочка и др.), то через 12—18 ч на поверхности агара отмечается рост бактерий искомого вида, пересевом которого с самой верхней части агара достигается получение чистой культуры. Для выделения анаэробов посевы на средах в пробирках, чашках Петри, помещают в эксикатор или анаэроостат.

Вопросы для самопроверки. 1. Классификация питательных сред. Общие требования к ним. 2. Приготовление МПБ, МПА, МПЖ, бульона Мартена, перевара Хоттингера. 3. Состав и назначение среды Китт — Тароцци. 4. Специальные и дифференциально-диагностические питательные среды. 5. Питательные среды для культивирования грибов. 6. Термостат, его устройство и назначение. 7. Типы конструкций терморегуляторов. 8. Характер проявления роста микробов в МПБ, на МПА. 9. Принцип устройства и использования эксикатора и анаэроостата. 10. Методы выделения чистой культуры микроорганизмов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРОБОВ

Сахаролитические свойства бактерий выявляют при посеве их на дифференциально-диагностические среды с разными углеводами и индикатором. Обычно такие среды готовят, добавляя к пептонной воде один какой-либо углевод и индикатор. Чаще применяют индикатор Андрэде, но можно использовать бромтимолблау, лакмус и др. (см. «Питательные среды»). Набор сред с разными углеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит, сахароза, дульцит, арабиноза, сорбит и др.), стерильное молоко простое, молоко с лакмусом, молоко с метиленовой синькой называют «пестрым рядом».

Посевы культур осуществляют по общепринятой методике бактериологической петлей или пастеровской пипеткой. После инкубирования в термостате учитывают результат ферментации углеводов: изменение цвета питательной среды (при индикаторе Андрэде — красное окрашивание) означает расщепление углевода и образование в среде кислых продуктов распада. Если при расщеплении данного углевода образуется не только кислота, но и газообразные вещества, последние вытесняют часть жидкости из «поплава-

ка» и пузырьки газа скапливаются в его верхней части. Для определения сахаролитических свойств часто применяют полужидкие среды, содержащие углеводы и индикатор ВР (смесь водного голубого с розоловой кислотой), а также плотные среды с углеводами и индикатором (например, агар Эндо, агар Левина, Плоскирева).

Для выявления протеолитической способности микроорганизмов исследуемую культуру засевают в МПЖ, простое молоко, иногда пользуются свернутой кровяной сывороткой лошади, коагулированным белком куриного яйца. Посев микробов в застывшую столбиком МПЖ производят уколом, погружая иглу (или петлю) с исследуемой культурой в глубь питательной среды до дна пробирки. Посевы с микробами, обладающие способностью расти при низкой температуре, оставляют при комнатной температуре (20—22°), остальные посевы инкубируют в термостате при 37°. В тех пробирках, где под действием ферментов произойдет протеолиз желатины, среда разжижается. Различные виды микробов разжижают МПЖ неодинаково.

Одни из них в виде воронки (возбудитель сибирской язвы), другие — в виде «чулка» (стафилококки), отмечают и послойное разжижение (синегнойная палочка) и др. (рис. 34).

Способность микробов гидролизовать казеин определяют на молочном агаре Э й к м а н а. К 10 мл стерильного расплавленного на водяной бане МПА добавляют 3 мл обезжиренного стерильного молока, смешивают и разливают в чашки Петри, остужают. Посев производят петлей и шпателем по всей поверхности среды, чтобы получить изолированные колонии. Выдерживают в термостате 24—48 ч. Протеолиз проявляется пептонизацией казеина: вокруг колоний образуется четкая прозрачная зона, просветление молочного агара. При посеве в ж и д к о е м о л о к о протеолиз также выражается просветлением столбика молока, водянистым содержимым и слизистым осадком на дне.

Степень протеолиза и глубину расщепления белка у разных видов бактерий определяют по образованию конечных продуктов распада (индол, сероводород, аммиак и др.).

И н д о л устанавливают различными методами. Наиболее доступным и удобным способом считают метод с использованием индикаторных бумажек, приготовленных по одному из следующих рецептов.

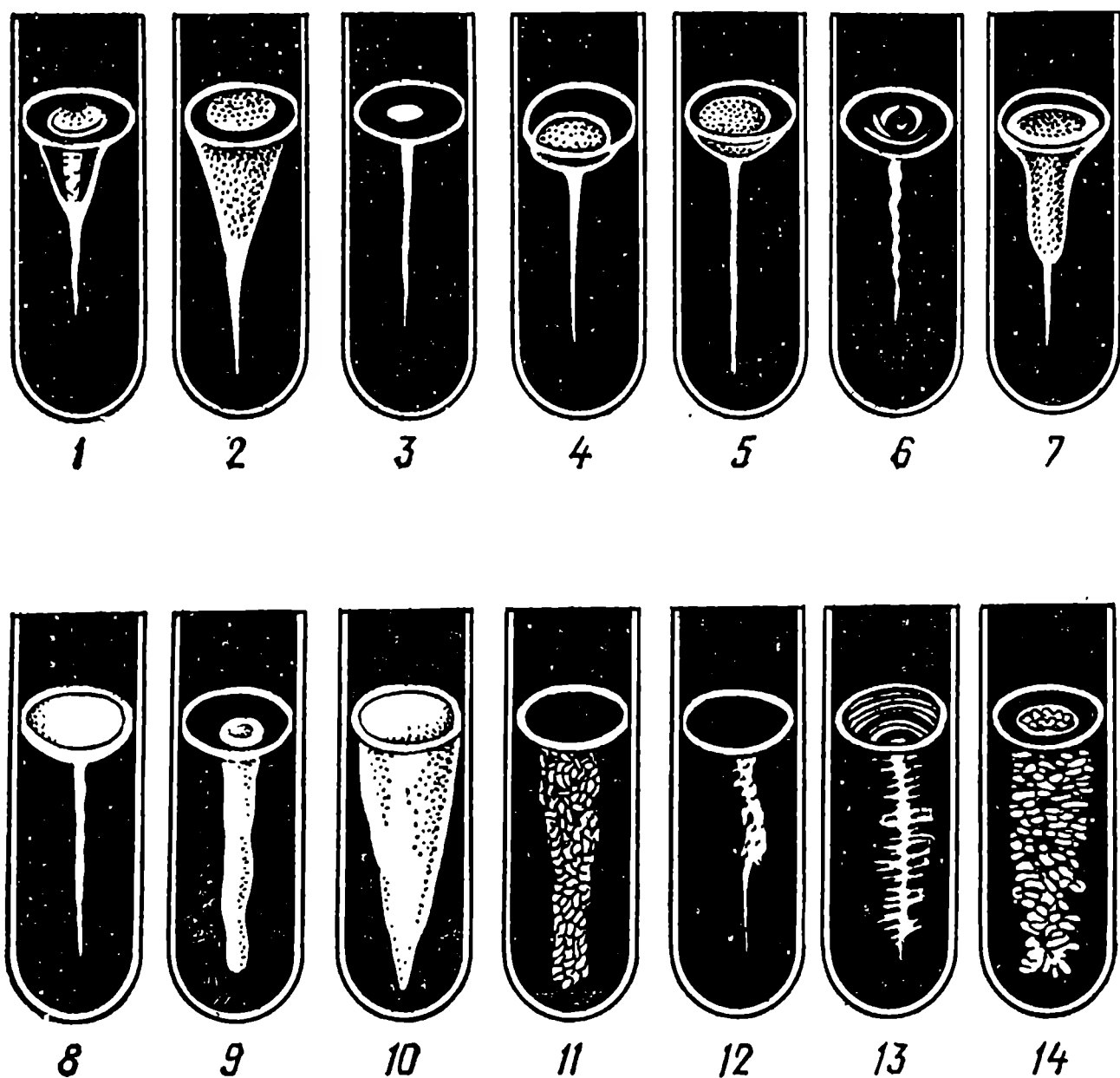


Рис. 34. Различные формы разжижения желатины.

1. Фильтровальную бумагу пропитывают горячим насыщенным (12%-ным) водным раствором щавелевой кислоты, высушивают на воздухе, разрезают на полоски размером $10 \times 0,5$ см и хранят в стеклянной банке с притертой пробкой. Чтобы выявить индол, исследуемую культуру бактерий засевают в пробирки с МПБ или бульоном Хоттингера, куда вставляют индикаторную бумажку, прижимая ее конец ватной пробкой (нижний край бумажки не должен касаться питательной среды). Выдерживают в термостате при 37° 1—3 дня.

При наличии индолообразования нижняя часть индикаторной бумажки окрашивается в розовый цвет (просматривать при проходящем свете).

2. Фильтровальную бумагу пропитывают теплой смесью, состоящей из парадиметиламиндобензальдегида (3—5,0), 96°-ного спирта-ректификата (50 мл), очищенной концентрированной соляной кислоты (10 мл). Бумагу высушивают на воздухе и разрезают на полоски. Цвет готовых бумажек желтый. Хранят их также в стеклянной банке с притертой пробкой. Индол выявляют так же, как и в предыдущем ре-

цепте. При наличии индола нижний край бумажки окрашивается от синевато-розового до интенсивно-малинового цвета (другой цвет не учитывают).

О п р е д е л е н и е с е р о в о д о р о д а проводят на плотной среде следующего состава: к 1 л стерильного 1,7—2%-ного МПА добавляют сернокислое железо (FeSO_4) 0,2, гипосульфит (тиосульфат) натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,3, глюкозу 1,0, индикатор фенолрот водный 0,3%-ный 12 мл. Среду разливают в стерильные пробирки по 5—6 мл, стерилизуют текучим паром 20 мин. Перед употреблением среду расплавляют и охлаждают в наклонном положении пробирки. Посев делают на скошенный агар, а затем уколом в нижнюю часть столбика среды. При наличии сероводорода под действием растущих бактерий столбик среды краснеет, нижняя часть окрашивается в черный цвет.

Другой метод определения сероводорода в жидкой среде основан на почернении полоски фильтровальной бумажки (сернистый свинец), пропитанный 10%-ным раствором уксуснокислого свинца.

О п р е д е л е н и е а м м и а к а (NH_3). 1. В пробирку с засеянной бактериальной культурой вкладывают (между краем пробирки и пробкой) розовую лакмусовую бумажку, которая в присутствии аммиака синее. 2. В фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю бульонной культуры микробов и каплю реактива Несслера, смешивают. При наличии аммиака в зависимости от его количества культура с индикатором приобретает желтое или коричневое окрашивание.

Реактив Несслера представляет собой смесь двух растворов: 1) йодистого калия с химически чистой сулемой и 2) 50%-ного раствора КОН.

Редуцирующие свойства микробов определяют на основании изменения цвета органической краски (метиленовая синька, малахитовая зелень, нейтральрот и др.), внесенной в питательную среду (чаще в молоко). Петлю исследуемой культуры высевают в среду с краской и инкубируют в термостате 24 ч. Под действием микробных ферментов краситель восстанавливается — обесцвечивается или изменяет свою первоначальную окраску. При обильном доступе кислорода краска может вновь окисляться и приобрести прежний цвет.

Редуцирующие свойства можно определить на среде Минкевича (молоко с лакмусовой настойкой). Посевы инкубируют в термостате 10 дней, ежедневно просматривая пробирки. Редукция лакмуса проявляется полным обес-

цвечиванием молока. На этой же среде выявляют кислото- и щелочеобразование. В первом случае лакмусовое молоко интенсивно розовеет, во втором — синеет.

Р е д у к ц и я н и т р а т о в (денитрификация) — способность микробов восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты), а затем в аммиак и свободный азот. Редукцию нитратов определяют посевом на специальную среду: к МПБ добавляют 2% азотнокислого калия (калийная селитра), свободного от нитритов, затем засевают культуру исследуемых микробов и через 48—72 ч культивирования в термостате при 37—38° добавляют 1 мл реактива, содержащего йодистый калий, и 10% H_2SO_4 в определенных пропорциях. При редукции нитратов в нитриты проявляется темно-синее окрашивание среды.

Определение каталазы. Некоторые виды микроорганизмов в процессе дыхания образуют перекись водорода, которая при участии фермента каталазы разлагается на воду и молекулярный кислород, поэтому количество ее в культуре не достигает высоких концентраций. Для определения каталазы на поверхность односуточной агаровой культуры наносят 1 мл 1%-ного раствора перекиси водорода так, чтобы поверхность культуры была покрыта тонким слоем. При наличии каталазы отмечают выделение пузырьков отщепленного кислорода.

Определение гемолитических свойств. Некоторые виды бактерий в процессе своей жизнедеятельности вырабатывают (продуцируют) особые вещества, обладающие лизирующим (растворяющим) действием на эритроциты. Вещества эти белковой природы, называются г е м о т о к с и н а м и. Для определения гемолитической способности производят посевы на питательные среды, содержащие 5% дефибринированной крови. Чаще используют кровяной МПА. При росте на кровяной среде микроорганизмов, обладающих гемолитическими свойствами, вокруг колонии в результате лизиса эритроцитов образуется прозрачная зона (бесцветная или окрашенная). В жидких питательных средах при гемолизе среда делается прозрачной (красная лаковая кровь).

Вопросы для самопроверки. 1. Методы определения сахаролитических свойств. 2. Определение протеолитических свойств бактерий. 3. Как определить редуцирующие свойства микробов? 4. Методы определения индола, сероводорода, аммиака. 5. Определение гемолитических свойств бактерий.

БАКТЕРИОФАГИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Бактериофаги — это вирусы бактерий, характеризующиеся облигатным паразитизмом, малой величиной (10—350 нанометров), специфическими антигенными свойствами. Паразитизм бактериофагов проявляется только в молодой бактериальной культуре, гомологичной (специфичной) фагу. Бактериофаги, актинофаги можно выделить из различных материалов, где содержатся живые микробы (из сточных вод, раневых секретов, фекалий животных и человека, почвы). Называют фаги по виду лизируемого ими микроба (фаги кишечной палочки, сальмонелл, дизентерийный фаг, сибиреязвенный и др.).

Для выделения фага исследуемый материал пропускают через бактериальные фильтры, фильтрат вносят в колбу с МПБ и засевают определенным видом бактерий. Все это ставят в термостат при 37° на 16—18 ч, а затем культуру вновь фильтруют и проверяют на наличие фага. С этой целью в 10 мл МПБ засевают 0,05 мл густой взвеси бактерий, добавляют 0,1 мл исследуемого фильтрата, помещают в термостат. Каждые 2 ч проверяют степень роста культуры (по образующейся мутности среды), сравнивая с контрольной пробиркой МПБ (та же культура, но без фильтрата). В первые часы инкубирования в опытных и контрольных пробирках отмечают рост культуры, но в последующем, в растущей культуре развившийся фаг лизирует молодую культуру, и в пробирках с добавленным фильтратом наступает просветление, мутность исчезает; в контрольных пробирках мутность увеличивается из-за обильного роста культуры.

Наличие фага можно определить и на плотных средах. На поверхность скошенного в пробирке МПА засевают микробную культуру так, чтобы она покрывала всю поверхность среды; подсушивают, затем наносят 1—2 капли фильтрата, давая им стечь сверху вниз по поверхности засеянной среды. Культуру ставят в термостат на 18—20 ч. При наличии фага, гомологичного засеянной культуре, по следу протекавшей капли фильтрата (фага) бактерии не растут, образуется своего рода «дорожка», вокруг которой отмечают обильный рост бактерий (см. рис. 75).

Учитывая специфичность фагов, их используют для диагностических целей, с их помощью производят идентифика-

цию бактериальных культур, выделяемых из исследуемого материала. При необходимости определения активности фага применяют специальные методы.

Метод д'Эрреля: к 10 мл взвеси бактериальной культуры в бульоне с концентрацией 250 млн. в 1 мл добавляют фаг в количестве 0,00002 мл (2×10^{-5}), встряхивают. 0,01 мл этой смеси растирают по поверхности пластинчатого агара в чашках Петри и ставят в термостат на 18 ч. После этого подсчитывают колонии фага («пятна» отсутствия роста бактерий).

Метод агаровых слоев (по Грациа). МПА (1,5%) с генцианвиолетом расплавляют, разливают в чашки Петри по 25—30 мл, прикрывают стерильной бумагой, высушивают под бактерицидной лампой несколько часов, закрывают крышкой, переворачивают вверх дном, оставляют на ночь при комнатной температуре. На следующий день полужидкий МПА (0,7%) в количестве 2,5 мл расплавляют в пробирке, остужают до 46—47°, вносят в него 1 мл исследуемого фага и 0,1 мл эталонной культуры. Вращая пробирку, быстро перемешивают и выливают эту смесь на поверхность агара в чашке, подготовленную накануне (рис. 35). Оставляют для затвердения на 30 мин, затем помещают в термостат на 5—7 ч. Для определения титра фага число колоний его в чашке умножают на использованную степень разведения.

Для идентификации микробов в объектах внешней среды (сточные воды и др.) и для диагностики инфекционных болезней используют **метод нарастания титра фага**, который позволяет обнаружить возбудителя непосредственно в исследуемом материале в присутствии посторонней микрофлоры. Методика определения заключается в следующем: навеску исследуемого материала без консерванта заливают МПБ в 10-кратном количестве (рН 6,8—7,0), встряхивают со стеклянными бусами 5 мин в шуттель-аппарате и разливают в две пробирки по 9 мл. В первую пробирку добавляют 1 мл индикаторного фага в известном титре и разведенного 1 : 100; в другую — 1 мл бульона (контроль на наличие свободного фага); третья пробирка — для контроля титра фага — 9 мл стерильного МПБ и 1 мл фага. Пробирки помещают в термостат при 37° на 4—5 ч. При наличии в материале микроорганизма, гомологичного фагу, происходит нарастание титра фага. Затем содержимое каждой пробирки разводят бульоном в 100, 1000 и 10 000 раз при 58°, 30 мин прогревают в водяной бане и исследуют по

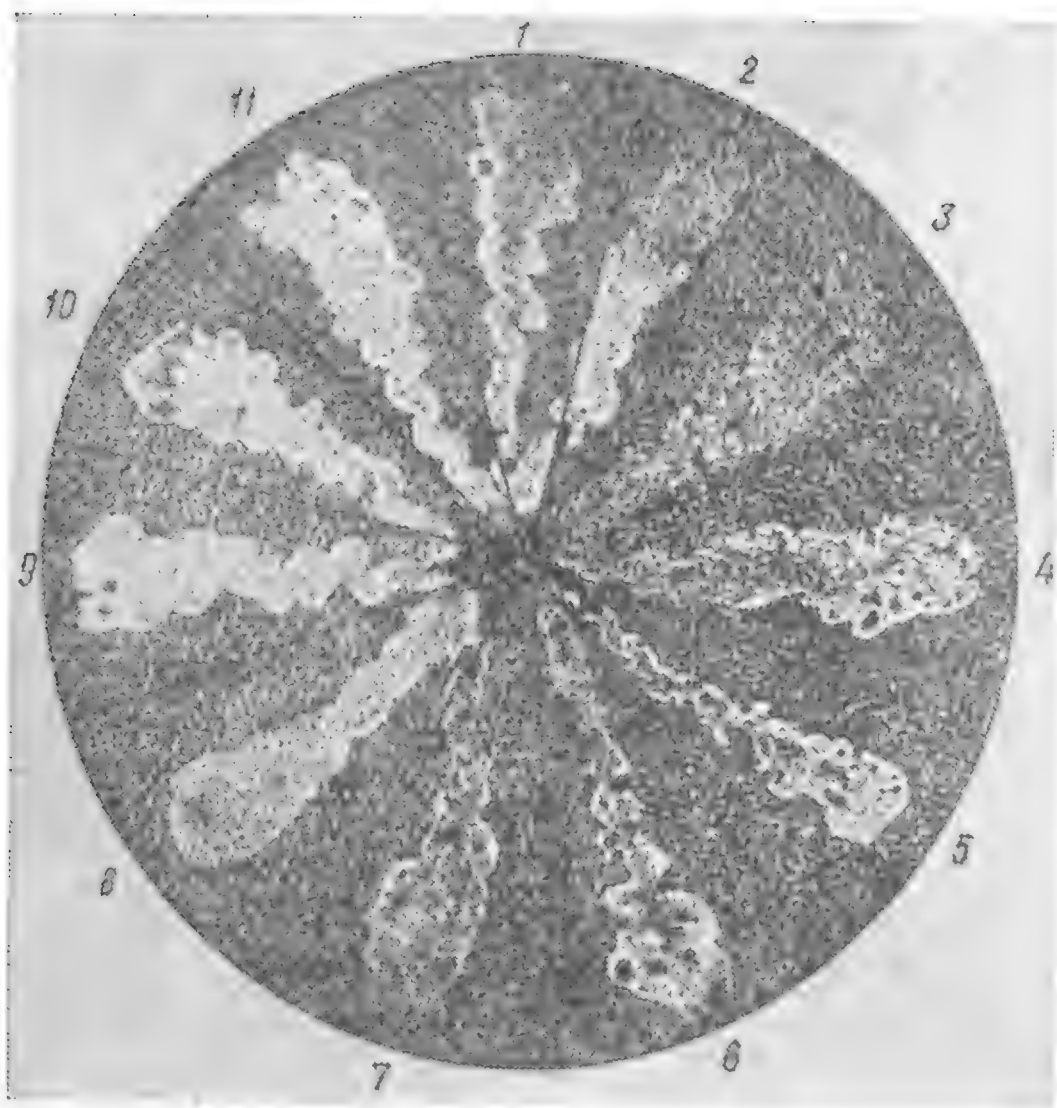


Рис. 35. Титрование бактериофага на плотной среде.

методу агаровых слоев с индикаторной культурой. Результат учитывают через 4—5 ч по колониям фага («пятнам»). Положительным результатом считают тот, при котором титр фага в опытной пробирке увеличился более чем в 5 раз по сравнению с контролем.

Методика рекомендуется при исследовании воды, почвы, молока и других материалов.

Вопросы для самопроверки. 1. Бактериофаг, его основные свойства. 2. Методы выделения фагов. 3. Феномен бактериофагии, его практическое использование. 4. Методы определения активности фага. 5. Определение специфичности фага. 6. Сущность реакции нарастания титра фага и практическое использование этой реакции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРОБОВ

Антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности бактерий, актиномицетов, грибов, растений и животных, обладающие высокой антимикробной активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов, задерживая их рост или полностью подавляя их жизнедеятельность.

По происхождению различают антибиотики, продуцируемые грибами и лишайниками (пенициллин, гризеофульвин и др.), актиномицетами (стрептомицин, неомицин, тетрациклин, эритромицин и др.), бактериями (грамицидин, полимиксин, тиротрицин, субтилин и др.), высшими растениями (аллицин, фитоалексин, препараты алоэ, фитонциды лука, чеснока и др.), и антибиотики животного происхождения (лизозим, эритроин, экмолин и др.).

В лечебной практике антибиотики делят по их спектру действия: действующие преимущественно на какую-то одну группу микроорганизмов (например, на грамположительные или грамотрицательные) или на разные группы микробов. Антибиотики изготавливают промышленным путем в виде солей калия, натрия, кальция и выпускают в специальных упаковках. Применяют их как кормовые добавки и стимуляторы роста молодняка; с этой целью антибиотики готовят в производственных отделах ветеринарных лабораторий. Во всех случаях перед выпуском препарата определяют его активность. Нередко приходится определять и концентрацию антибиотиков в исследуемом материале.

Биологическую активность антибиотиков выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл раствора (ЕД/мл) или в 1 мг препарата (ЕД/мг). За единицу антибиотической активности принимают минимальное количество антибиотика, которое подавляет рост стандартного тест-микроба в определенном объеме питательной среды. Для установления активности каждого антибиотика используют свойственный для него тест-микроб: для пенициллина — золотистый стафилококк 209-Р, для стрептомицина и тетрациклина — штаммы *Bac. subtilis*, для биомицина, левомицетина — *E. coli*. Установлено, что 1 мг чистого основания стрептомицина эквивалентен 1000 ЕД, следовательно, 1 ЕД эквивалентна одному мкг данного антибиотика.

Единица биологической активности не у всех антибиотиков одинаковая: 1 ЕД неомицина эквивалентна 3,3 мкг, пенициллина — 0,6 мкг, бацитрацина — 20 мкг чистого вещества. Весовое количество антибиотика, эквивалентное одной единице биологического действия его, называют международной единицей действия (МЕ).

Активность антибиотиков определяют химическим, но чаще биологическим методом, в основе которого лежит установление интенсивности прямого воздействия препарата на живую микробную клетку. Для этих целей приме-

няют метод с е р и й н ы х р а з в е д е н и й в жидких и плотных питательных средах. В штатив ставят 20 пробирок в два ряда и в каждую вносят по 1 мл среды. В пробирках первого ряда готовят последовательные разведения стандартного антибиотика, для чего в пробирку добавляют 1 мл антибиотика, раствор перемешивают и 1 мл его переносят в следующую пробирку и т. д. В две последние пробирки антибиотик не вносят, они служат контролем. В пробирках второго ряда по той же методике разводят испытуемый антибиотик. Затем во все пробирки обоих рядов добавляют тест-микроб в соответствующей концентрации. Пробирки выдерживают в термостате при 37° 18—24 ч. Наименьшее количество (наибольшее разведение) препарата, в котором отсутствует рост тест-микроба, сопоставляют с таким же разведением стандартного антибиотика и определяют содержание его в 1 мл арифметическим подсчетом, принимая во внимание степень разведения.

В лабораторных условиях применяют ч а ш е ч н ы й (или кольцевой) м е т о д с использованием бумажных дисков, пропитанных растворами различных концентраций испытуемого антибиотика.

Техника выполнения данного метода. Готовят серию последовательных разведений испытуемого препарата в пробирках на физиологическом растворе (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000 и т. д.). В несколько чашек Петри со стерильным агаром сплошь по всей поверхности высевают тест-микроб. Со дна чашки карандашом по стеклу поверхность подразделяют на четыре сектора. В центр каждого сектора на засеянный агар кладут стерильный бумажный диск (диаметр 0,6 см), пропитанный раствором антибиотика соответствующей концентрации. Чашки Петри выдерживают в термостате при 37° 16—18 ч. Вокруг дисков в зависимости от активности и концентрации антибиотика в растворе образуются разной величины зоны задержки роста тест-микроба. Наименьшие зоны точно измеряют с помощью циркуля и линейки. Исследования проводят параллельно со стандартным антибиотиком (известной активности).

Для каждой концентрации стандартного и испытуемого антибиотика вычисляют среднее арифметическое число. Расчет активности производят по стандартной кривой или по специальным таблицам. Для выбора наиболее эффективного антибиотика определяют чувствительность (антибиотикорезистентность) возбудителя болезни к нескольким антибиотикам.

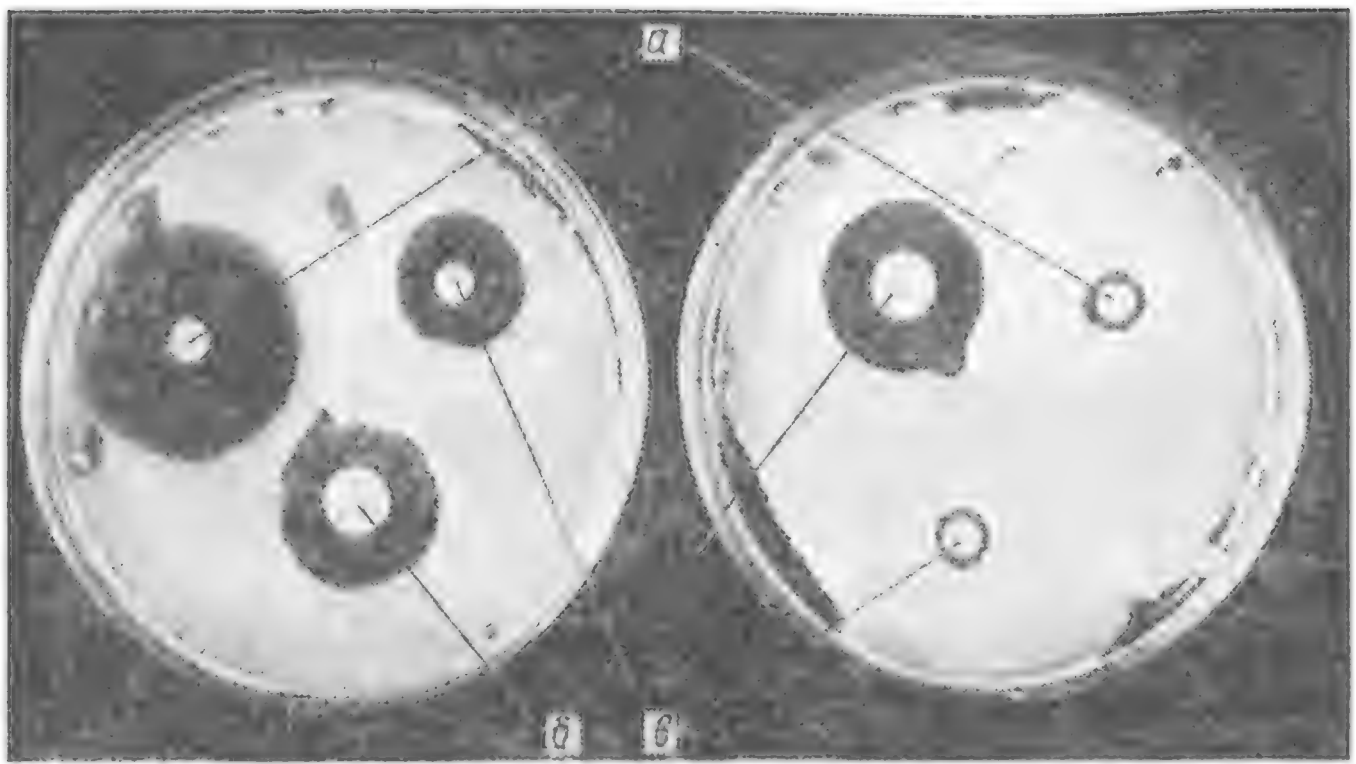


Рис. 36. Различная чувствительность двух штаммов стафилококков к антибиотикам:

a — к пенициллину; *б* — к стрептомицину; *в* — к неомицину.

В стерильные чашки Петри с ровным дном наливают по 20 мл МПА или агара на переваре Хоттингера с содержанием 120—140 мг% аминного азота, рН 7,2—7,4. Исследуемую культуру возбудителя болезни, выделенного из патологического материала, смывают с агара физиологическим раствором, готовят одномолиардную взвесь и 1 мл ее засевают сплошным слоем по всей поверхности агара. Излишек жидкости отсасывают пипеткой. Засеянные чашки подсушивают в термостате 15—30 мин при 37°C. Бумажные диски, пропитанные разными антибиотиками (лучше фабричного производства), раскладывают на засеянный агар стерильным пинцетом на расстоянии 2 см от края, слегка прижимая к среде. В одной чашке можно испытать 4—5 антибиотиков. Чашки с дисками выдерживают при комнатной температуре (не выше 20°) 2—3 ч, затем 14—15 ч в термостате при 37°. Учет результатов производят по величине зоны задержки роста микробов вокруг бумажных дисков, включая их диаметр (рис. 36). Если зона задержки роста равна 15—25 мм, микробы считаются чувствительными к антибиотику, до 15 мм — малочувствительными; отсутствие такой зоны указывает на резистентность бактериальной культуры к данному антибиотику (чувствительности нет).

При выявлении антибиотикоустойчивых штаммов бактерий используют метод диффузии в агаре с применением дисков. Более точное исследование проводят методом се-

рийных разведений в соответствии с «Указаниями по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных».

Вопросы для самопроверки. 1. Классификация антибиотиков по их происхождению. 2. Единицы измерения биологической активности антибиотиков. 3. Методы определения активности антибиотиков. 4. Определение чувствительности (резистентности) бактерий к антибиотикам.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ МИКРОБОВ. ЗАРАЖЕНИЕ И ВСКРЫТИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Патогенность микроорганизма, выделенного при исследовании патологического материала, определяют биологической пробой (биопробой), то есть заражением лабораторных животных: белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов, голубей, кошек. В особых случаях используют собак (чаще щенков), кур, мелкий и крупный рогатый скот (телят), обезьян, лошадей и др. Выбор вида животного для биопробы основывается на его восприимчивости к исследуемому объекту. Для биопробы берут не только выделенную микробную культуру, но и непосредственно патологический материал, из которого для этой цели готовят взвесь растертой в стерильной ступке ткани органов, гной, слизь, разбавленные физиологическим раствором. Биологическая проба необходима при установлении безвредности биологических препаратов (вакцин, сывороток).

Помещение для содержания лабораторных животных (виварий) должно иметь несколько отделений: карантинное, клиническое для проведения отдельных работ (взятие крови, заражение, вскрытие и др.), кладовую, кухню и др.

Перед заражением животных метят: кроликов и морских свинок металлическими «сережками» с номерами, белых мышей и крыс — раствором краски (фуксина, метиленовой синьки и др.). Для удобства и безопасности работы животных фиксируют. Морских свинок помощник держит брюшком вверх так, чтобы средний палец левой руки находился на шее, а большой и указательный — под передними конечностями животного. Правой рукой придерживают задние конечности. Мышь берут одной рукой за кончик хвоста, другой — за кожную складку затылка, ближе к ушам и поворачивают в удобное для заражения положение. Крыс фиксируют корнцангами, захватив складку кожи затылка,

плотно прижимают голову к поверхности стола, другой рукой держат за хвост и поворачивают в удобное для заражения положение, оттягивая корнцангом голову.

Животных заражают следующими методами: накожным (скарификация), внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутривенным, внутрибрюшинным, оральным, интраназальным, интрацеребральным и в переднюю камеру глаза. Используемые при этом инструменты (шприцы, иглы и др.) должны быть стерильными.

При скарификации скальпелем делают небольшой надрез кожи — насечку и в нее апплицируют исследуемый материал или бактериальную культуру (как при прививании оспы). Испытуемый материал можно также втирать жесткой щеточкой. Место заражения выстригают и дезинфицируют.

При внутрикожном способе пальцами левой руки оттягивают кожу и в образующуюся между ними кожную складку вводят кончик иглы. Вводимая доза материала не должна превышать 0,2 мл. Показатель правильного введения — небольшая припухлость величиной с горошину.

При подкожном инфицировании пальцами левой руки оттягивают кожу, в образовавшийся «кармашек» складку вводят иглу шприца, затем его содержимое. Место заражения у кроликов — со стороны спины несколько сбоку, у белых мышей и крыс — со спины ближе к основанию хвоста. Объем вводимого вещества не должен превышать для мышей 1 мл, для крыс, морских свинок — 10 мл, кроликов — 20—25 мл (рис. 37, 38).

Для внутримышечного заражения инъецируемый материал чаще вводят с внутренней поверхности бедра. Голубей и кур можно заражать также и в грудную мышцу. Доза введения при этом методе мышам — 0,5 мл, морским свинкам и крысам — 3—5 мл, кроликам — 5—8 мл. Большие количества лучше вводить дробно, в 2—3 места.

При внутрибрюшинном заражении животное фиксируют головой вниз, иглу шприца вводят в нижнюю треть живота, чуть отступя от белой линии.

Внутривенно исследуемый материал кроликам вводят в краевую вену уха, мышам и крысам — в вену хвоста. Перед заражением место инъекции протирают тампоном, смоченным ксилолом или теплой водой, чтобы вызвать наполнение сосудов кровью.

Интрацеребральное заражение проводят на животных, фиксированных в спинном положении. У кро-

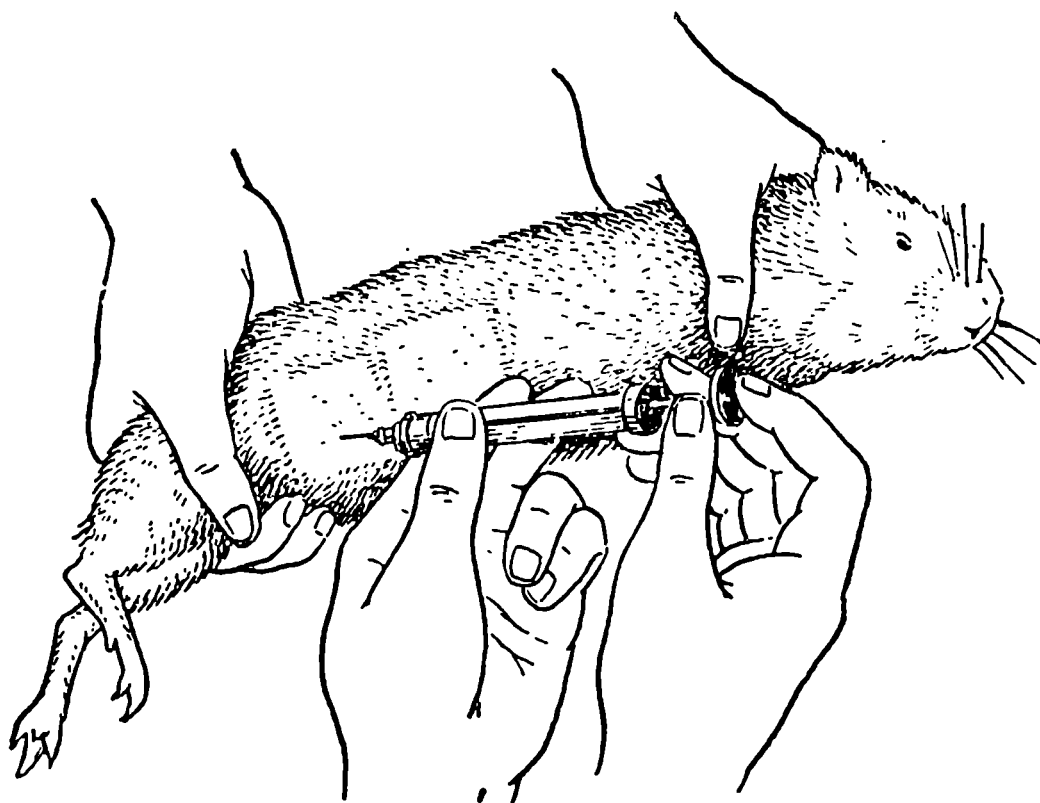


Рис. 37. Подкожное заражение морской свинки.

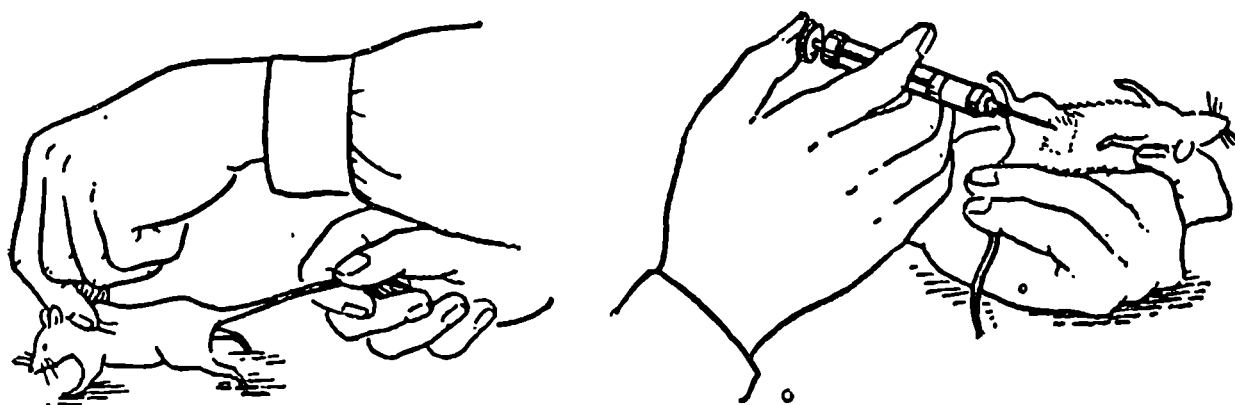


Рис. 38. Заражение белой мыши:

а — фиксация; б — введение материала шприцем.

ликов для этой цели трепанируют череп в участке между надбровным углом и черепным гребнем. Поле операции выстригают, дезинфицируют, пальцами левой руки растягивают кожу над глазницей параллельно черепному гребню и рассекают ее (раздвигают ее края), крестообразно разрезают надкостницу, маленьким трепаном прокалывают черепную кость и извлекают небольшой кусочек ее; из шприца вводят 0,2 мл исследуемого материала. После этого соединяют края надкостницы, края кожной раны заливают коллодием.

У мышей и крыс трепанацию не делают, а легким проколом костной ткани вводят кончик иглы и инъецируют материал.

Интраназально заражение осуществляют капельным способом, используя глазную пипетку. Предварительно животное слегка наркотизируют — к носу прикладывают вату, смоченную эфиром.

При оральном заражении исследуемый материал добавляют в корм, воду или вводят через небольшой зонд.

В случае гибели зараженного животного труп вскрывают, соблюдая правила асептики, и производят бактериологическое исследование.

Для вскрытия труп фиксируют в спинном положении (брюшком вверх) на деревянной доске или лотке с застывшим парафином. Конечности трупа растягивают и закрепляют мелкими гвоздиками. Кожно-шерстный покров дезинфицируют 5%-ным раствором фенола или лизола. Разрезают кожу вдоль белой линии от промежности до грудиноключичного сочленения, а затем делают поперечные надрезы. Отпрепарированные кожные лоскуты отводят в сторону. Так же надрезают брюшину, вскрывают брюшную полость, подрезают ребра, диафрагму, вскрывают грудную полость. При вскрытии трупа животного обращают внимание на патологоанатомическую картину.

После этого прижигают поверхность сердца, печени, почки и других органов, пипеткой прокалывают этот участок, насасывают небольшое количество крови и высевают ее на питательные среды, соблюдая стерильность. Если в органах имеются очаги поражения, то из них пастеровской пипеткой также производят посев на питательные среды. Наряду с посевами готовят и препараты-отпечатки из тканей органов: отрезают кусочек печени, селезенки, почки, лимфатических узлов и к поверхности разреза прикладывают предметное стекло; препарат высушивают, фиксируют, окрашивают и микроскопируют.

После окончания работы трупы утилизируют — помещают в металлические бачки, заливают хлорноизвестковым молоком или 5—10%-ным раствором хлорной извести, затем сжигают.

Вопросы для самопроверки. 1. Виды животных, используемых для биопробы, и методы их фиксации. 2. Методы заражения животных. 3. Порядок вскрытия и бактериологическое исследование трупа. 4. Обеззараживание трупов лабораторных животных.

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЫ, ВОЗДУХА, ВОДЫ И МОЛОКА

Основные задачи санитарно-микробиологических исследований состоят в том, чтобы определить состояние того или иного объекта как возможного источника инфицирования людей, животных (в том числе птиц, рыб).

Санитарно-бактериологическое исследование почвы. Для исследования берут стерильно 10 проб почвы с площади 25 м² на глубине 10—20 см, смешивают и 1 кг этой смеси направляют в лабораторию с указанием места взятия проб, характеристики почвы, цели исследования, даты.

П о р я д о к исследования; навеску пробы почвы заливают стерильной водой (1 : 10), взбалтывают в течение 10 мин, фильтруют через несколько слоев марли. Из фильтрата делают последовательные разведения в пробирках со стерильной водой: из первой пробирки 0,5 мл вносят во вторую с 4,5 мл воды, из второй — 0,5 мл в третью (1 : 1000) и т. д. до разведения $\times 10^{-9}$ (песчаные почвы, незагрязненные — 5—7 разведений). Другой стерильной пипеткой из пробирок № 9, 8, 7, 6, 5 и 4 вносят 1 мл в стерильные чашки Петри (по отдельности из каждой пробирки), заливают расплавленным и охлажденным до 43—45° МПА (15—20 мл), равномерно перемешивают осторожными круговыми движениями, оставляют до застывания агара. Культивируют в термостате двое суток при 28—30°, затем подсчитывают колонии в каждой чашке (вычисляют среднее арифметическое число). Например: из 8-го разведения в чашке выросло 6 колоний, их не учитывают. Из 7-го разведения выросла 31 колония, из 6-го — 180, из 5-го — 320. Из 4-го — сплошной рост, он не учитывается.

Подсчет:

$$\begin{array}{r} 31 \times 10\,000\,000 = 310\,000\,000 \\ + 180 \times 1\,000\,000 = 180\,000\,000 \\ \cdot 320 \times 100\,000 = 32\,000\,000 \\ \hline 522\,000\,000 \end{array}$$

Среднее арифметическое число равно $522\,000\,000 : 3 = 174\,000\,000$ микробов в 1 г исследуемой почвы.

О п р е д е л е н и е коли - т и т р а почвы. Коли-титром почвы называют наименьшее количество ее, содержащее кишечную палочку. В зависимости от предполагаемого загрязнения микробами кишечной группы готовят разведения суспендированной пробы почвы в среде Кесслера (на 1 л дистиллированной воды 10,0 пептона, 50 мл желчи, 2,5 лактозы, 4 мл 1 %-ного водного раствора генцианвиолета), из расчета содержания почвы 0,1; 0,01; 0,001 г. Если в почве содержится большое количество бактерий, разводят из расчета содержания почвы 0,001; 0,0001; 0,00001 и 0,000001 г. По 1 мл каждого разведения в отдельности

вносят в пробирку с газовой и 9 мл среды Кесслера, инкубируют при 43° 48 ч. При отсутствии помутнения среды и газообразования результат отрицательный. Из пробирок, где имеется помутнение среды и газообразование, делают пересев на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Левина, Плоскирева) и культивируют при 37° 24 ч. Рост типичных для кишечной палочки колоний, наличие в препаратах-мазках грамотрицательных палочек дают основание считать результат положительным. Для определения коли-титра можно применить метод мембранных фильтров (см. «Санитарно-бактериологическое исследование воды»).

Санитарная оценка почвы по титру кишечной палочки примерно следующая: если кишечную палочку обнаруживают в 0,001 почвы и ниже, — загрязнение считается сильным; 0,01—0,001 — загрязнение умеренное; 0,1—0,01 — загрязнение слабое.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха. Для санитарной оценки воздуха животноводческих и других помещений определяют общее количество микроорганизмов в 1 м³, применяя один из следующих методов.

Седиментационный метод Коха. В помещении ставят открытую чашку Петри со стерильным МПА на 20—30 мин, закрывают крышкой и ставят в термостат при 37° на двое суток (в рабочей тетради отмечают место и время взятия пробы воздуха). Затем ведут подсчет колоний в чашке и вычисляют количество бактерий в 1 м³ по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot v} 1000,$$

где X — количество бактерий в 1 м³; A — количество колоний на МПА в чашке; b — площадь чашки; 100, 5, 10 — экспериментально установленные Омелянским числовые показатели (на площади в 100 см² за 5 мин оседают микробы из 10 л воздуха); v — время, в течение которого взята проба воздуха; 1000 — пересчет на 1 м³ воздуха.

Для подсчета санитарно-показательных микроорганизмов (гемолитических стафилококков, стрептококков) используют глюкозно-кровяной агар, для определения грибов — среду Сабуро.

Фильтрационный метод более точный. Через бактериоуловитель пропускают определенное количество воздуха (100—150 л). Прибор представляет собой

сосуд со стеклянными бусами на дне, в который наливают физиологический раствор или МПБ (50—100 мл). После пропускания воздуха через данную систему 1 мл жидкости из сосуда разливают в чашки Петри и заливают расплавленным и охлажденным (45—50°) МПА, культивируют двое суток при 37°, подсчитывают выросшие колонии; затем число колоний умножают на объем жидкости, делят на количество литров пропущенного воздуха и умножают на 1000.

Аспирационный метод. При этом методе используют прибор Кротова, представляющий собой цилиндр, внутри которого находится электромотор с центробежным вентилятором и вращающимся диском-подставкой для чашки Петри с МПА. В крышке цилиндра имеется клиновидная щель, через нее всасывается исследуемый воздух; количество последнего определяют ротаметром (рис. 39).

Санитарную оценку воздуха производят в зависимости от объекта исследования. Например, воздух жилых помещений считают чистым, если в летний период общее количество микробов в 1 м³ составляет 1500, гемолитических стрептококков не более 16; в зимний период соответственно 4500 и 36.

Вопросы для самопроверки. 1. Определение общего количества микроорганизмов в 1 г почвы. 2. Показатели, используемые для санитарной оценки почвы и воздуха. 3. Санитарная оценка почвы по колититру. 4. Методы определения общего количества микробов в воздухе.

Санитарно-бактериологическое исследование воды. С поверхности водоема или из крана водопровода пробу берут в стерильные флаконы с притертой пробкой емкостью 0,5 л, а с глубины — привязанным к шесту батометром или стеклянным сосудом с притертой пробкой, к которой прикреп-

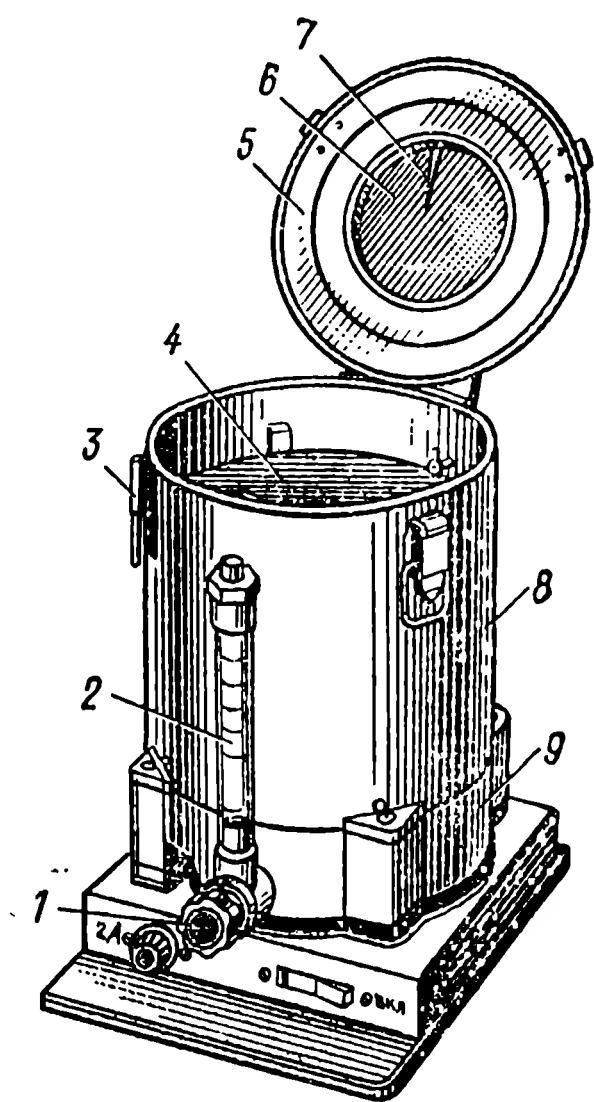


Рис. 39. Внешний вид прибора для бактериологического анализа воздуха:

1 — вентиль ротаметра; 2 — ротаметр; 3 — накладные замки; 4 — диск вращающийся; 5 — крышка; 6 — диск; 7 — клиновидная щель; 8 — корпус; 9 — основание.

бренных фильтров. Сущность *бродильного метода* заключается в том, что пробу исследуемой воды в определенных количествах высевают на среду накопления, затем при наличии роста, характерного для кишечной палочки, пересевают на дифференциально-диагностические среды.

Порядок исследования: водопроводной воды берут три объема по 100 мл (каждый в отдельности), три — по 10 мл и три — по 1 мл, а сточной воды — четыре объема: 1,0; 0,1; 0,01 и 0,001 мл. Воду в этих количествах высевают в колбы (или флаконы) и пробирки с глюкозопептонной или лактозопептонной средой с индикатором и поплавками.

Состав используемой среды: 10,0 пептона, 5,0 поваренной химически чистой соли, 5,0 глюкозы, 1 л дистиллированной воды и 10 мл индикатора Андрэдэ. Концентрированную среду готовят так же, только все ингредиенты, кроме воды, берут в 10 раз больше.

В 10 мл концентрированной среды вносят 1000 мл исследуемой воды, в 1 мл концентрированной среды — 10 мл воды. Воду 1,0, 0,1 мл и меньшие количества вносят в пробирки с 10 мл неконцентрированной (обычной) среды. Все посевы помещают в термостат на 24 ч при 37°. При отсутствии роста микробов, образования кислоты и газа результат отрицательный. Из колбочек (пробирок), в которых имеется рост кишечной палочки (помутнение и изменение цвета среды), производят высев штрихом на поверхность среды Эндо или Левина и ставят в термостат при 37° на 16—18 ч.

Из колоний, характерных для кишечной палочки на этой среде, готовят препараты-мазки для микроскопирования. Культуру изучают по оксидазному тесту: фильтровальную бумагу смачивают (*ex tempore*) раствором d-нафтола и диэтил-п-фенилендиаминам и накладывают на колонии. Отсутствие изменения в окраске бумажки (отрицательный результат оксидазной пробы) и наличие грамотрицательных палочек в мазке свидетельствуют о росте кишечной палочки.

Если коли-титр выше установленных норм, исследование повторяют. Для установления фекального загрязнения, посевы культивируют при 43° для дифференциации от кишечной палочки холоднокровных, не растущей при данной температуре. По ГОСТу титр кишечной палочки для водопроводной воды должен быть не менее 333 мл, для воды открытых водоемов — ориентировочно не менее 111 мл (табл. 1, 2).

Т а б л и ц а 1. Определение коли-титра и коли-индекса водопроводной воды

Количество положительных результатов анализа воды из			Коли-титр	Коли-индекс
трех флаконов по 100 мл	трех пробирок по 10 мл	трех пробирок по 1 мл		
0	0	0	Более 333	3
0	0	1	333	3
0	1	0	333	3
1	0	0	250	4
1	0	1	143	7
1	1	0	143	7
1	1	1	91	11
1	2	0	91	11
2	0	0	111	9
2	0	1	72	14
2	1	0	67	15
2	1	1	50	20
2	2	0	48	21
2	2	1	86	28
3	0	0	43	23
3	0	1	26	39
3	0	2	16	64
3	1	0	23	43
3	1	1	13	75
3	1	2	8	120
3	2	0	11	93
3	2	1	7	150
3	2	2	5	210
3	3	0	4	240
3	3	1	2	460
3	3	2	0,9	1100
3	3	3	Меньше 0,9	Выше 1100

Т а б л и ц а 2. Определение коли-титра и коли-индекса открытых водоемов

Объем исследуемой воды в мл				Коли-титр	Коли-индекс
100	10	1	0,1		
—	—	—	—	Выше 111	Менее 9
—	—	+	—	111	9
—	+	—	—	105	10
+	—	—	—	43	23
+	—	+	—	10	94
+	+	—	—	4	230
+	+	—	+	1	960
+	+	+	—	0,4	2380
+	+	+	+	Менее 0,4	Более 2380

Примечание: +рост; —нет роста.

Метод мембранных фильтров. Мембранные фильтры № 2 или № 3, изготовленные из нитроцеллюлозы или нитрохлорвинила, хорошо промывают горячей водой и монтируют их в воронке Уленгута и колбе Бунзена или другом сосуде-приемнике. Исследуемую (водопроводную) воду под давлением пропускают через фильтр не менее 333 мл, воды из открытых водоемов 0,1; 1,0 и 10 мл. Затем фильтры с соблюдением правил асептики переносят на плотную среду Эндо и помещают в термостат при 37°. Через 18—24 ч подсчитывают колонии кишечной палочки, их количество умножают на 1000, полученный результат делят на объем профильтрованной воды, то есть определяют число кишечных палочек в 1 л воды — коли-индекс.

Если вода очень загрязнена, то ее обычно берут в 10 или 100 раз меньше и соответственно учитывают показатели коли-титра и коли-индекса.

Вопросы для самопроверки. 1. Правила взятия проб воды для санитарно-бактериологического исследования. 2. Определение общего количества микробов в воде. 3. Определение коли-титра воды. Порядок определения коли-индекса. 4. Питательные среды, применяемые для бактериологического исследования воды. 5. Оценка воды по санитарно-бактериологическим показателям.

Санитарно-бактериологическое исследование молока и молочных продуктов проводят с целью определения (косвенным путем) возможного их загрязнения патогенными микроорганизмами. Для исследования берут молока 50 мл, масла 20,0, сыра 10,0. Время от момента взятия проб до начала исследования не должно превышать 4 ч при условии хранения при температуре не выше 6°.

Определение общего количества бактерий в 1 мл молока: по принятой методике готовят разведения молока от $\times 10^1$ до $\times 10^7$ — 10^8 и из трех последних разведений по 1 мл вносят в стерильные чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным МПА. Когда среда застынет, ее ставят в термостат при 37° на 48 ч. Выросшие колонии подсчитывают, число их умножают на степень разведения и определяют среднее количество микробов в 1 мл молока.

Оценка молока по количественному содержанию бактерий: 1-й класс — менее 500 тыс. бактерий в 1 мл, 2-й класс — 500 тыс.— 4 млн., 3-й класс — 4—20 млн. и 4-й класс — более 20 млн. бактерий в 1 мл.

Ориентировочно количество бактерий в 1 мл можно определить пробой на редуктазу, используя при этом метиле-

новую синьку или резазурин. Учитывают скорость обесцвечивания молока: чем она больше, тем больше в молоке микроорганизмов.

О п р е д е л е н и е к о л и - т и т р а м о л о к а и м о л о ч н ы х п р о д у к т о в. Для этого пользуются бродильной пробой на модифицированной среде Кесслера: 10,0 пептона, 50,0 желчи крупного рогатого скота, 2,5 глюкозы, 1 л дистиллированной воды, 2 мл 10%-ного раствора кристаллвиолета и бродильная трубочка. Разведения исследуемых продуктов приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3. Разведения исследуемых продуктов

Наименование продукта	Засаеваемые разведения	Количество пробирок со средой, засеваемой из каждого разведения
Молоко, сливки сырые	1:10 000 до 1:100 тыс.	1
Молоко, сливки пастеризованные	1 до 1:10	3
Кисломолочные продукты	То же	То же самое
Творог, сметана	1:10—1:100 тыс.	1
Масло	1, 1:10, 1:100 и 1:1000	2
Мороженое	1:10	3

Из пробирок с указанными выше разведениями продуктов (табл. 3) высевают по 1 мл в среду Кесслера и культивируют при 43° 18—24 ч. Для идентификации кишечной палочки делают посев из пробирок со средой Кесслера, в которых есть рост, на среду Эндо, а после суточного инкубирования типичные для кишечной палочки колонии высевают на среду Козера (1,5 фосфорнокислого натрия-аммония; 1,0 KPO_4 ; 0,2 $MgSO_4$; 2,5—3,0 лимоннокислого натрия и 10 мл 0,5%-ного спиртового раствора бромтимолового синего) и среду с лактозой и индикатором Андрэдэ.

В случае подтверждения роста кишечной палочки в среде Кесслера вычисляют коли-титр продукта и делают его оценку по этому показателю. Если рост кишечной палочки отсутствует во всех пробирках, то коли-титр продукта выше 3; наличие кишечной палочки только в одной пробирке — коли-титр 3; рост кишечной палочки в двух, трех или четырех пробирках — коли-титр 0,3; если палочка выросла в пяти или во всех шести пробирках — коли-титр менее 0,3.

При коли-титре выше 3 молоко считается хорошим.

Вопросы для самопроверки. 1. Определение общего количества бактерий в молоке. 2. Определение коли-титра молока.

МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В основе всех серологических исследований лежит специфическая реакция между антигенами и антителами.

Антигены — генетически чужеродные вещества, при введении в организм животного (и человека) вызывают ответную реакцию (*антигенное свойство*) в виде продуцирования защитных тел — антител, специфических по отношению к антигену. Различают антигены корпускулярные, клеточные (бактерии, эритроциты) и растворимые (молекулярно-дисперсные). Антигены поливалентны — имеют несколько детерминантных рецепторов для связи с антителами, способны вступать в реакцию с антителами (*антигенная функция*) как в организме животного (*in vivo*), так и вне организма — в пробирке (*in vitro*). Антигенной функцией обладают не только полноценные антигены, но и неполноценные (гаптены), то есть вещества небелковой природы (полисахариды, липидо-полисахаридный комплекс соматического антигена микробной клетки и др. вещества).

Антитела — высокомолекулярные белки глобулиновой фракции сыворотки крови (иммуноглобулины).

По проявлению феномена взаимодействия между антигеном и антителом *in vitro* различают: осадочные реакции, лизирующие и нейтрализующие. Антитела, участвующие в осадочных реакциях, получили названия по своему взаимодействию с антигеном: агглютинины — вызывают склеивание корпускулярного антигена и осаждение комплекса антиген-антитело (агглютината) и преципитины — образуют преципитат с растворимым антигеном. В реакциях лизиса участвуют бактериолизины и гемолизины, обуславливающие лизис, распад корпускулярного антигена. Нейтрализующие антитела обезвреживают, нейтрализуют токсическое действие антигена.

В серологических реакциях, применяемых для диагностических целей, один из компонентов должен быть известен, по которому ввиду их специфичности определяют наличие другого компонента. Например, если взять заведомо известный антиген (сапной, бруцеллезный, перипневмонийный) и с ним исследовать сыворотки крови от животных, то положительный результат реакции с данным антигеном указывает на наличие в сыворотке соответствующих антител —

то есть сыворотка получена от больного животного. И, наоборот, при наличии специфической сыворотки (гипериммунная сибиреязвенная, сальмонеллезная и др.) определяют видовую принадлежность (идентифицируют) возбудителя болезни, выделенного из исследуемого материала.

Серологические реакции ставят на физиологическом растворе потому, что реакция между антигенами и антителами происходит в слабоэлектролитной среде.

Реакция агглютинации (РА). Сущность РА заключается в том, что при добавлении сыворотки крови, содержащей специфические антитела, к равномерной взвеси клеток происходит их склеивание, образование глыбок, комочков, хлопьев, которые постепенно оседают на дно пробирки, формируя характерный осадок — *агглютинат*, жидкость над ним просветляется. Характер агглютината зависит от антигенного строения микробной клетки (антигена). Если антигеном является взвесь неподвижных бактерий (без жгутиков), имеющих только соматический О-антиген, образуется мелкозернистый осадок в течение 16—22 ч. Если антигеном служит взвесь бактерий, имеющих жгутики (подвижные виды), и в агглютинации участвует наряду с соматическим еще жгутиковый Н-антиген, формируется крупнохлопчатый, крупнозернистый агглютинат. В ветеринарной практике РА используют для диагностики бруцеллеза, сальмонеллез, колибактериоза, листериоза, вибриоза, лептоспирозов и других заболеваний. Существует несколько методов постановки РА: пробирочный (объемный), капельный (пластинчатый), кровяно-капельный, гемагглютинации, торможения гемагглютинации, антиглобулиновый Кумбса, РА по Кастеллани (метод адсорбции агглютининов), кольцевая проба (реакция) с молоком.

Для определения антител (по известному антигену) берут 5—10 мл крови из яремной вены животного (у свиней из хвостовой) в стерильные пробирки и помещают в теплое место. После образования сгустка осторожно (стерильно!) отделяют его от стенок пробирки, обводя металлической проволокой (вязальной спицей), и ставят в холодное место для ретракции (отделения) сгустка. Сыворотку отсасывают в стерильные пробирки, нумеруют их, с нарочным и препроводительным письмом отсылают в лабораторию.

В РА (как и вообще при серологических исследованиях) используют свежие сыворотки без гемолиза или консервированные фенолом, мертиолатом натрия или борной кисло-

той. Антиген для РА представляет собой взвесь в физиологическом растворе убитых или живых бактерий. Для диагностических целей рекомендуется стандартный антиген биофабричного производства. Если же необходимо идентифицировать бактериальную культуру, выделенную из патологического материала, применяют стандартные сыворотки, а антиген готовят из суточной культуры — смыва с МПА. Специфические стандартные агглютинирующие сыворотки получают на биофабриках путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (специально подготовленной взвесью живых или убитых микробов, эритроцитами и др.). Готовую сыворотку консервируют, разливают в ампулы и запаивают. Нередко диагностические сыворотки подвергают лиофильному высушиванию. Перед употреблением такие сыворотки разводят дистиллированной водой. Но для постановки реакции (и промывания пипеток) ее разводят физиологическим раствором.

Постановка РА классическим (пробирочным) методом. Исследуемые сыворотки разводят в чистых сухих пробирках с ровным сферическим дном. Для каждой сыворотки берут отдельную пипетку. В зависимости от инфекции производят соответствующие степени разведения сывороток (согласно инструкции). Например, для диагностики бруцеллеза сыворотки разводят 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400.

Удобно разведения производить следующим образом. В отдельной пробирке готовят основное (исходное) разведение сыворотки — 1 : 25, смешивая 0,1 мл испытуемой сыворотки с добавлением 2,4 мл физиологического раствора. В опытные пробирки разливают по 1 мл физиологического раствора. Затем из исходного разведения 1 мл жидкости переносят в первую опытную пробирку, смешивают с физраствором (разведение 1 : 50) и 1 мл переносят во вторую пробирку (1 : 100), из второй 1 мл — в третью и т. д. Из последней пробирки 1 мл выливают в сливную чашку, чтобы в каждой пробирке осталось по 1 мл разведенной сыворотки (рис. 41). Во все пробирки добавляют по две капли стандартного антигена (концентрация 10 млрд. микробных тел в 1 мл), смешивают встряхиванием и выдерживают в термостате 4—6 ч при 37°, а затем при комнатной температуре 14—16 ч.

При постановке РА (как при каждой серологической реакции) обязательны контроли: в тех же разведениях испытывают сыворотку нормальную (от здорового животного)

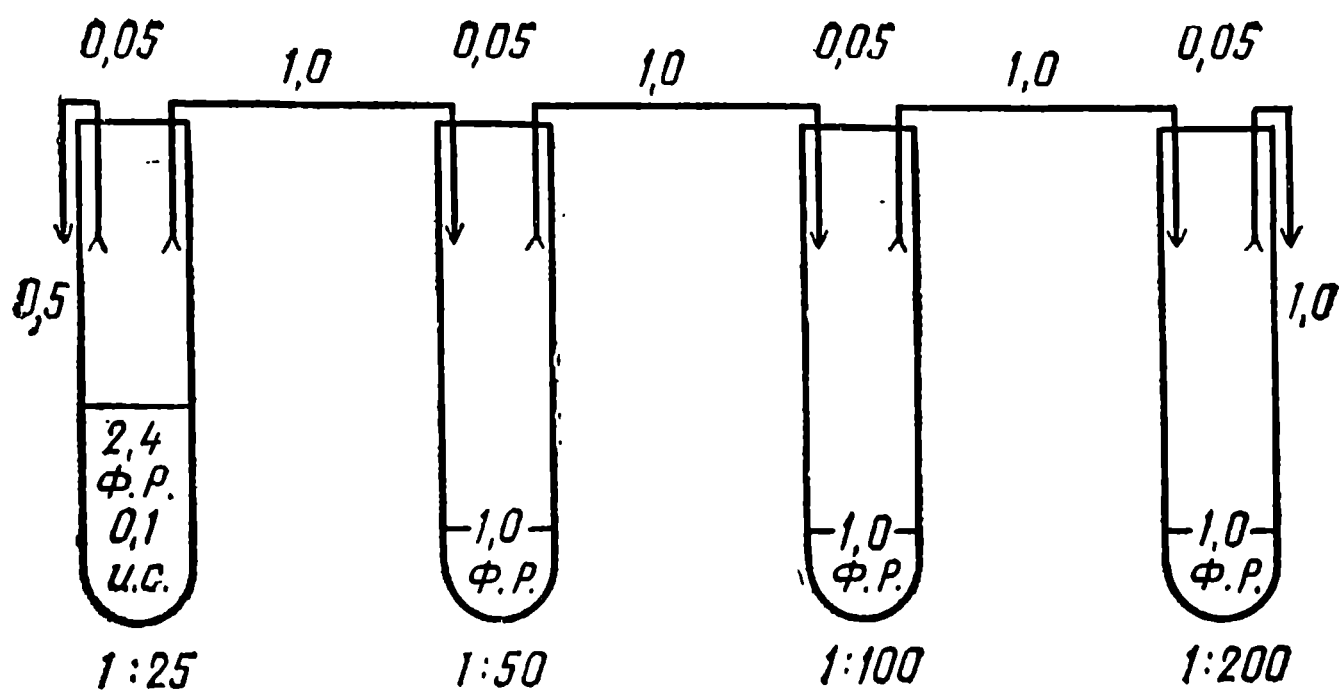


Рис. 41. Схема постановки РА.

и позитивную (от заведомо больного животного или стандартную биофабричного производства) с тем же антигеном.

Для контроля антигена в 1 мл физиологического раствора добавляют две капли антигена для исключения самоагглютинации.

Учет РА проводят невооруженным глазом или с помощью агглютиноскопа (рис. 42), начиная с контрольных пробирок. Результат РА принято выражать количеством крестов:

++++ (#) — полное просветление жидкости, образовавшийся агглютинат в виде перевернутого зонтика, при встряхивании разбивается в глыбки, хлопья разной величины, жидкость остается прозрачной (рис. 43);

+++ (++) — неполное просветление жидкости, характер агглютината, как и в предыдущем, в виде зонтика, при встряхивании разбивается на более мелкие глыбки, комочки;

++ (++) — обозначают реакцию агглютинации неполную, с неполным просветлением жидкости, агглютинат в виде зонтика, но при встряхивании разбивается на хлопья разной величины, жидкость мутная;

+ — наличие небольшого нехарактерного осадка в виде «пуговки», жидкость над ним мутная. При встряхивании такой осадок легко разбивается, увеличивая мутность;

— (минус) — вся жидкость в пробирке мутная, на дне пробирки небольшой осадок антигена с ровными краями в виде «пуговки» и при встряхивании разбивается в равномерную муть.

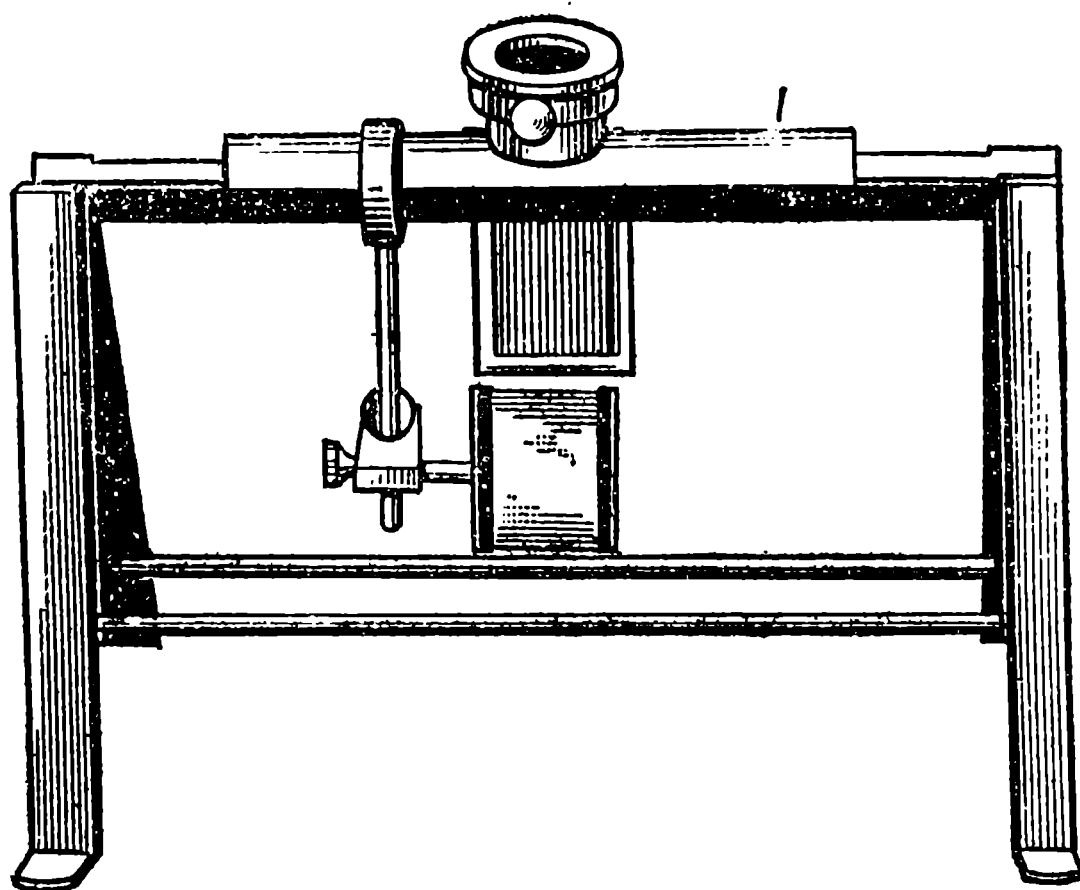


Рис. 42. Агглютиноскоп.

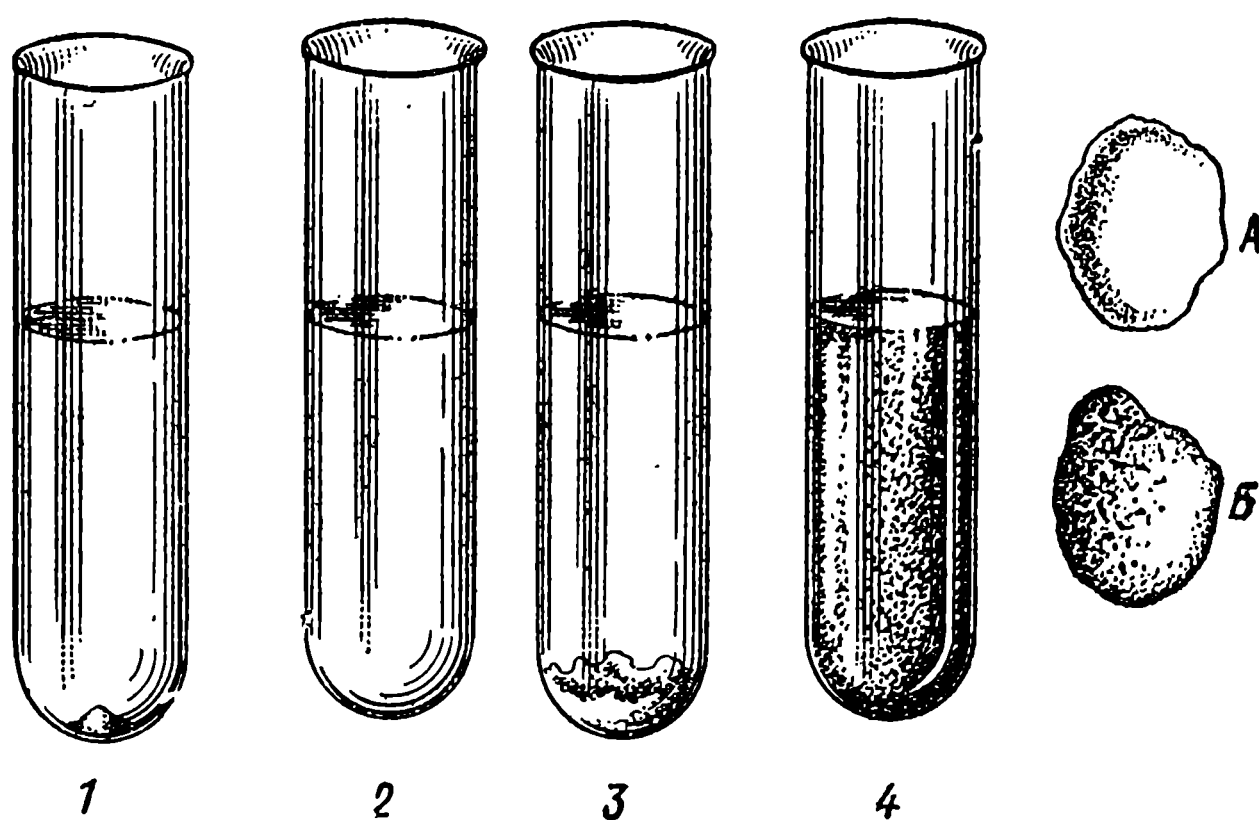


Рис. 43. Реакция агглютинации:
пробирочный метод (1 и 2 — отрицательная; 3 и 4 — положительная);
пластинчатый метод (А — отрицательная; Б — положительная).

РА в 3—4 креста учитывается как положительная степень проявления агглютинации, в два креста — сомнительная, один крест или отсутствие агглютината — выражает отрицательный результат. Реакцию оценивают не только по степени выраженности РА (++++, +++ или ++), но и по высоте титров, то есть степени разведения сывороток, давших положительный результат РА. Например, для диагностики бруцеллеза крупных животных диагностическим титром считают положительный результат РА с сывороткой в разведении не ниже 1 : 100, при сальмонеллезном аборте кобыл — выше 1 : 500.

Капельный (пластинчатый) метод РА используют для быстрого обследования поголовья животных в лаборатории и в условиях хозяйства. На чистую стеклянную пластинку наносят микропипеткой исследуемую сыворотку по 0,04; 0,02; 0,01 и 0,005 мл. К каждой сыворотке добавляют по одной капле антигена определенной концентрации, постепенно смешивают чистой стеклянной палочкой, начиная с наименьшего количества сыворотки. Условно считают, что сыворотка в первой капле соответствует разведению 1 : 50, во второй — 1 : 100, в третьей — 1 : 200, в четвертой — 1 : 400. Через 2—3 мин производят учет. Для ускорения реакции стекло слегка подогревают высоко над пламенем горелки.

Положительный результат проявляется образованием в капле сыворотки комплекса антиген-антитело в виде крупинок, хлопьев, жидкость становится прозрачной. При отрицательном результате капля смеси сыворотки и антигена остается равномерно мутной (отсутствие в сыворотке антител).

Пластинчатым методом РА пользуются также для ориентировочного определения вида микроба или его идентификации (типизации). На предметное стекло наносят каплю известной специфической сыворотки и отдельно каплю физраствора (для контроля). В каждую каплю добавляют культуру испытуемого микроба в количестве, взятом бактериологической петлей, и равномерно размешивают. Положительная реакция указывает на гомологичность антигена с известным антителом (рис. 44).

Кровяно-капельный метод РА чаще применяют для диагностики пуллороза (сальмонеллеза птиц) и бруцеллеза. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю цельной крови (взятой у птиц из гребешка или сережки), в нее добавляют каплю соответствующего антигена и смешивают

стеклянной палочкой. Для лучшей видимости феномена агглютинации биопромышленность выпускает антиген, подкрашенный гематоксилином.

В положительных случаях РА (когда в крови имеются специфические антигену антитела) через 30—60 с в капле смеси появляются глыбки, хлопья склеенного антигена (агглютинат).

Кольцевую пробу (реакцию) с молоком в основном используют при обследовании крупного рогатого скота на бруцеллез и при контроле сборного молока. В агглюти-

национные пробирки наливают по 2—3 мл свежего цельного молока и добавляют антиген (окрашенный гематоксилином) по 0,2 мл (2 капли). Пробирки встряхивают до равномерного окрашивания молока, выдерживают в водяной бане (или термостате) при 37° 45—60 мин. Если в молоке имеются антитела, образуется комплекс антиген-антитело, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывает наверх, образуя синее кольцо в нижнем слое сливок; столбик молока обесцвечивается. Отрицательная реакция характеризуется синей окраской всего молока в пробирке и слегка желтоватым слоем сливок.

РА методом адсорбции антител (по Кастеллани). У отдельных видов микробов наряду со специфическими видовыми антигенами имеются еще групповые, общие с другими видами одного рода или семейства бактерий. При введении в организм животного (и человека) таких бактерий (например, сальмонелл) образуются антитела как против видоспецифических, так и групповых (общих разным видам) антигенов. Если в реакции участвует микроб, обладающий групповым и типовым антигенами, то происходит полная агглютинация общих (групповых) и типоспецифических антигенов, при этом из сыворотки все антитела адсорбируются. Если антиген не типоспецифичен антителам, происходит реакция агглютинации за счет групповых антигенов и

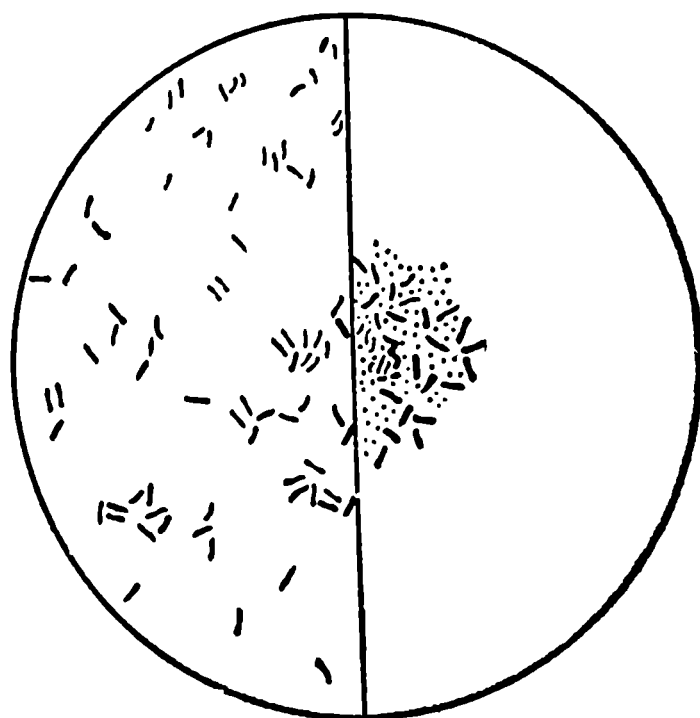


Рис. 44. Агглютинация под микроскопом:

вид нормальной культуры сальмонелл (слева) и та же культура после агглютинации (справа).

групповых антител, типоспецифические антитела в сыворотке остаются.

Адсорбированные групповые антитела удаляют: сыворотки с групповым агглютинатом центрифугируют, а надосадочную жидкость (сыворотку с оставшимися типоспецифическими антителами) отсасывают и вновь используют в РА. Так как сыворотка, истощенная групповыми антигенами, содержит только специфические антитела, она будет реагировать положительно лишь со специфическим антигеном. На этом принципе основан метод получения монорецепторных сывороток.

Вопросы для самопроверки. 1. Антигенное строение микробной клетки. 2. Антитела, их классификация. 3. Какие компоненты необходимы для постановки РА? Контроли, их выполнение. 4. Назначение физиологического раствора в серологических реакциях. 5. Техника постановки и принцип учета пробирочной РА. 6. Пластинчатый метод РА. Кольцевая проба с молоком. 7. Сущность метода РА по Кастеллани.

Реакция Кумбса. В ряде случаев при постановке РА не отмечают выпадения агглютината. Одной из причин этого является наличие в сыворотке больных животных наряду с полными антителами так называемых неполных или блокирующих антител, которые тормозят образование агглютината (выпадение комплекса антиген-антитело в виде осадка). Методика выявления неполных антител в организме больного разработана Кумбсом.

Прямая реакция Кумбса заключается в том, что к эритроцитам больного животного добавляют специфическую антиглобулиновую сыворотку (содержащую антитела против глобулинов сыворотки). Эритроциты агглютинируют. При *непрямой реакции* исследуют сыворотку больного, которую соединяют с эритроцитами здорового животного, затем, как и при прямом методе, добавляют антиглобулиновую сыворотку. Блокирующие (неполные) антитела соединяются с эритроцитами, и добавленная антиглобулиновая сыворотка, вступая в реакцию с неполными антителами, приводит к агглютинации эритроцитов, нагруженных неполными антителами.

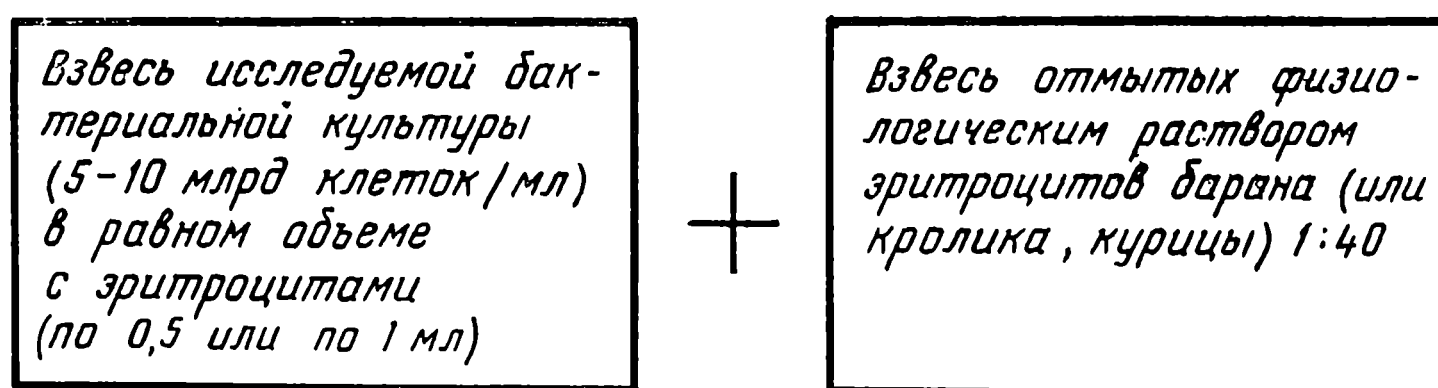
Для диагностических целей в ветеринарии разработана удобная модификация методики реакции Кумбса — бактериальный вариант, в котором вместо эритроцитов применяют специфический бактериальный антиген.

Бактериальный вариант реакции Кумбса. С исследуемыми сыворотками ставят обычную РА. После учета результата реакции в пробирки, в которых отсутствует агглютинация,

добавляют по 2 мл физраствора и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 1 мл антиглобулиновой сыворотки в рабочем титре (установленный предварительно). Центрифужные пробирки встряхивают, содержимое переносят в агглютинационные пробирки, ставят их в термостат при 37—38° на 16—18 ч, а затем выдерживают еще 1 ч при комнатной температуре. Учет производят по характеру агглютината, как при обычном методе РА. Реакция Кумбса очень чувствительная и позволяет более точно выявлять больных.

Реакция гемагглютинации (РГА) основана на том, что некоторые виды бактерий и вирусов обладают способностью адсорбироваться на поверхности эритроцитов разных видов животных (и птиц), вызывая их склеивание и образование агглютината (*прямая РГА*). Схема постановки ее следующая:

Схема 1



Встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Учитывают результат.

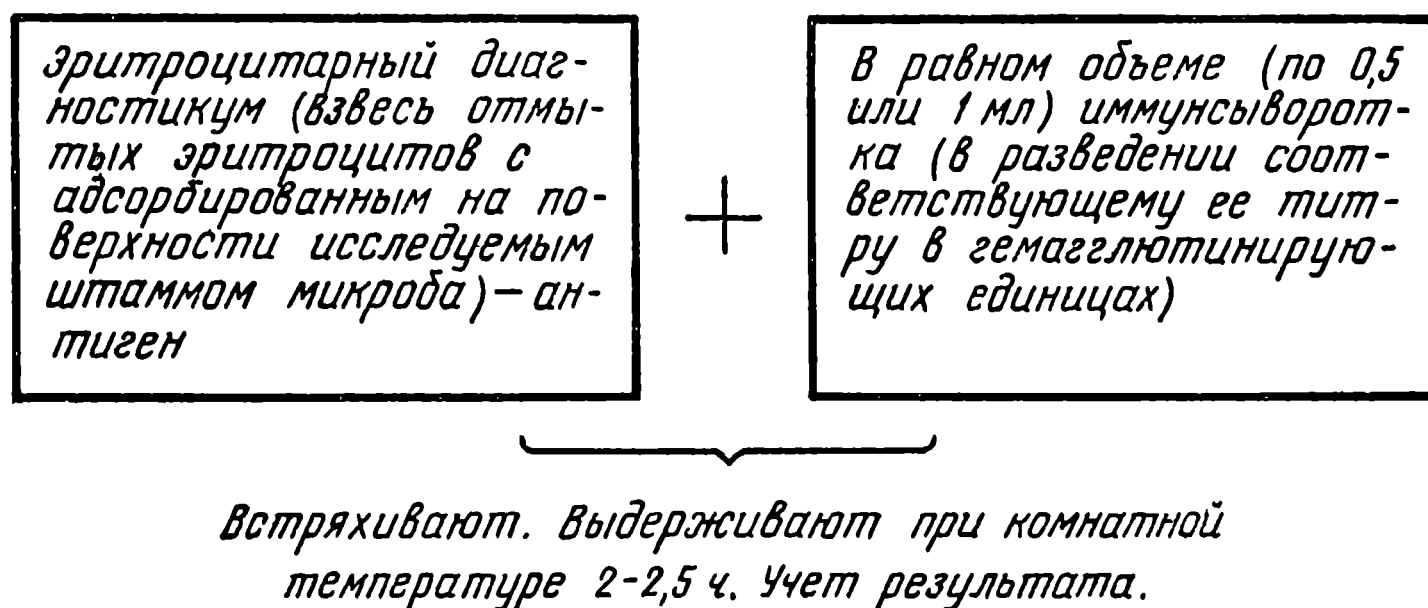
Адсорбция антигена (бактерий, вирусов) на поверхности эритроцитов не всегда проявляется образованием видимого осадка; кроме того, РГА неспецифична, потому что эритроциты одного и того же вида животного могут адсорбировать различные антигены.

Специфической является реакция *пассивной* (непрямой) гемагглютинации (РПГА). Для ее постановки предварительно готовят эритроцитарный диагностикум (эритроциты, на которых адсорбирован антиген). С этой целью стерильно получают кровь барана (или петуха), дефибринируют ее и несколько раз отмывают в фосфатно-буферном растворе (рН 7,2) при 3—5-кратном центрифугировании. Надосадочную жидкость удаляют, концентрацию эритроцитов доводят до 2,5% (1: 40). К 2,5%-ной взвеси эритроцитов добавляют

в равном объеме (по 1 мл или по 0,5 мл) взвесь бактерий исследуемого вида микроба в концентрации 5—10 млрд. клеток в 1 мл. Эритроциты легко адсорбируют антиген полисахаридной природы. Для адсорбции антигена белковой природы эритроциты предварительно обрабатывают танином в разведении 1: 20 000. Эритроциты в комплексе с добавленным антигеном оставляют для сенсibilизирования (адсорбции) на 2 ч в термостате (37°), затем вновь центрифугируют при 3—4 тыс. об/мин в течение 5 мин с фосфатно-буферным раствором.

Полученный эритроцитарный диагностикум помещают в пробирки (или лунки в плексигласовой доске) и добавляют к нему стандартную иммунную сыворотку, как указано в приведенной схеме 2.

Схема 2



В положительных случаях произойдет РГА — выпадение эритроцитов в характерный хлопьевидный или зернистый осадок, распределенный по всей поверхности дна пробирки (гемагглютинат). Значит, исследуемый вид микроба (антиген) специфичен антителам иммунсыворотки. В отрицательных случаях несклеенные эритроциты осядут на дно в виде небольшого ровного кружочка.

Для бóльшей достоверности результатов РПГА проводят реакцию задержки (торможения) феномена гемагглютинации (РЗГА) или ее модификацию — реакцию нейтрализации антител (РНА).

Сущность РЗГА заключается в том, что реакцию агглютинации ставят со специфической диагностической сывороткой и испытуемым антигеном (исследуемый вид микроба используют как антиген). Эту смесь выдерживают 1—2 ч при 37°, затем добавляют эритроциты. Если испытуемый

антиген гомологичен антителам диагностической сыворотки, они взаимодействуют друг с другом и добавленные эритроциты не агглютинируют — результат реакции положительный. Если испытуемый антиген не гомологичен антителам сыворотки или он не содержится в материале, добавленные эритроциты адсорбируют антиген и происходит РГА — результат РЗГА отрицательный, вид испытуемого микроба (антигена) не установлен.

Методика постановки РНА заключается в том, что в равных объемах смешивают диагностическую иммунсыворотку с различными разведениями исследуемого материала (искомого антигена), оставляют для контакта на 1—2 ч, затем добавляют эритроциты, сенсibilизированные определенным (известным) антигеном, специфическим по отношению к антителам сыворотки (эритроцитарный диагностикум). Когда искомый антиген вступает в реакцию с антителами сыворотки, происходит их нейтрализация и добавленные эритроциты не агглютинируют, РГА не происходит — результат РНА положительный. Если в исследуемом материале не содержится антиген, специфический к антителам используемой сыворотки, нейтрализации антител не будет; поэтому при добавлении эритроцитарного диагностикума проявляется агглютинация эритроцитов (гемагглютинация), а результат РНА отрицательный. Реакция нейтрализации антител — высокочувствительный метод обнаружения антигена не только во взвеси живых (или убитых) бактерий, но и во взвеси растертой ткани различных органов, нативных и гретьх секретах и экскретах больного организма.

Реакция преципитации (РП) основана на том, что при соединении антигена (преципитиногена) со специфическими антителами (преципитинами), находящимися в соответствующей сыворотке, образуется осадок — преципитат. В РП используют растворимые антигены, получаемые путем экстракции из разрушенных бактерий или извлеченные из тканей. Преципитиногены резистентны к действию высокой температуры (кипячению, автоклавированию) и гниению. Постановка РП может осуществляться в пробирках в жидкой среде и в чашках Петри (или на предметном стекле) в плотной агаровой среде (диффузионная преципитация).

В ветеринарии обычно используют реакцию кольцепреципитации (с целью диагностики сибирской язвы) по Асколи (1910). Для постановки реакции кольцепреципитации ис-

пользуют специфическую преципитирующую сыворотку биофабричного производства. Антигеном в РП служит фильтрат живой или убитой нагреванием микробной культуры или экстракт из исследуемого материала. Экстрагирование производят либо кипячением, либо длительным (18—24 ч) экстрагированием физиологическим раствором NaCl при комнатной температуре. Экстракт фильтруют через асбестовую вату до полной прозрачности.

В узкие пробирки Уленгута диаметром 4 мм пастеровской пипеткой наливают 0,3—0,4 мл сыворотки. Антиген (другой пипеткой) осторожно добавляют (наслаивают) по стенке пробирки, не касаясь пипеткой сыворотки. Пробирку держат вертикально. Если же в пробирку сначала внести антиген, то сыворотку нужно подслаивать под антиген. Для этого, чтобы предотвратить смешение компонентов, пипетку с сывороткой опускают на дно пробирки и осторожно выливают сыворотку в том же количестве, что и антиген (сыворотка имеет бóльшую плотность). В том и другом случае при положительном результате на границе двух жидкостей почти сразу или в течение 1—2 мин образуется резко отграниченное беловатое кольцо или диск — преципитат (рис. 45).

Реакцию диффузионной преципитации осуществляют путем наслаивания антигена на поверхность агара, содержащего специфическую сыворотку (по Удену), или путем внесения сыворотки в специальные лунки в агаре, содержащем антиген (по Аухтерлони, 1948).

Широкое использование получил *метод двойной диффузии* (рис. 46). В застывшем в чашках Петри или на предметном стекле агаровом геле делают углубления (луночки) на некотором расстоянии друг от друга. В одну из них вносят

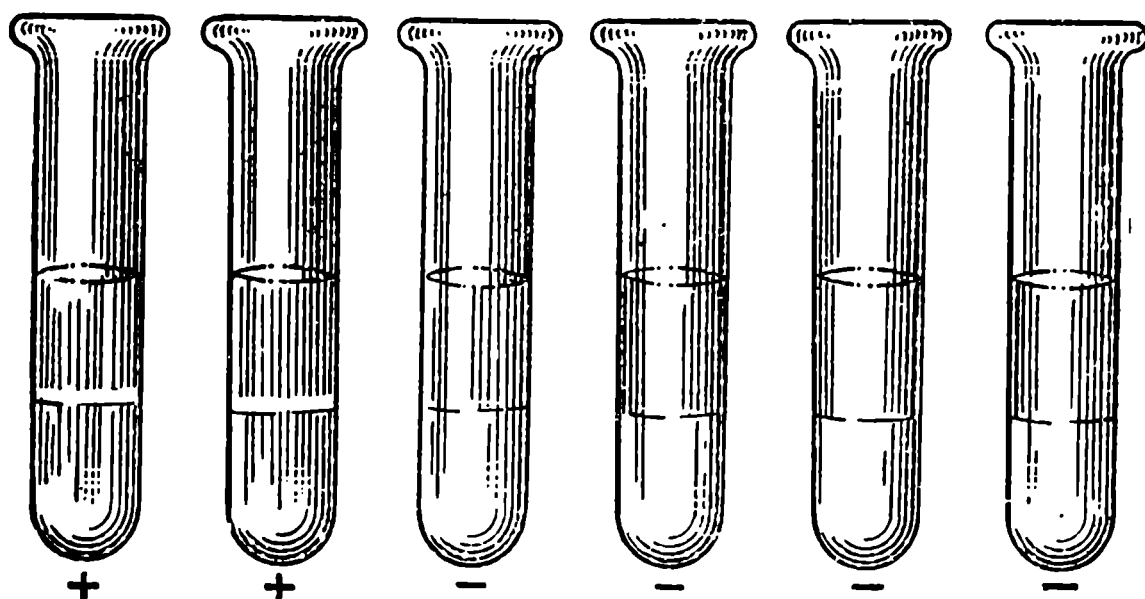


Рис. 45. Реакция преципитации в пробирках.

специфическую сыворотку, в другие, расположенные вокруг первой,— разные пробы антигена (исследуемый материал). Оба компонента в луночках (сыворотка и исследуемый материал) диффундируют во встречном направлении в слое агарового геля. На месте встречи специфических антиген-антитело выпадает сероватый преципитат. Для РП должна быть нейтральная среда. В кислой среде образуется неспецифический осадок. Щелочная среда тормозит проявление специфической РП.



Рис. 46. Реакция преципитации в агаровом геле:

из лунок А и В антиген (М) диффундирует в агар. Аналогично из лунки Б диффундирует сыворотка, содержащая антитела (преципитины) по направлению к антигену. По линии контакта между ними происходит РП (широкая белая линия). В лунке Г сыворотка с незначительным количеством антител — линия преципитата едва заметна между А и Г.

Реакция флоккуляции (Рамон, 1922) используется для выявления токсинов и определения активности антитоксических сывороток. В пробирки, содержащие по 10 мл определенного токсина, добавляют убывающие количества специфической токсину антитоксической сыворотки (1,0; 0,9; 0,8 ... 0,3 и т. д.), полученную от гипериммунизированного животного (например, лошади). Пробирки встряхивают, оставляют при комнатной температуре, а через некоторое время в них наблюдают опалесценцию, переходящую в четко выраженное помутнение, затем образуются хлопья и выпадает осадок. Это *инициальная флоккуляция*, появляющаяся первоначально в отдельных пробирках, а затем и в соседних с ними, является показателем эквивалентности антигена (токсина) и антитела (антитоксина), при котором происходит полное взаимосвязывание антигена и антитела (токсина и антитоксина), полная нейтрализация токсина. В пробирках, где нет полного насыщения, флоккуляция наступает позднее (рис. 47).

Вопросы для самопроверки. 1. Сущность реакции Кумбса и ее преимущество. 2. Реакция гемагглютинации (прямой и непрямой варианты). 3. Постановка и учет РЗГА и РНА. 4. Реакция преципитации, ее практическое использование. 5. Методы постановки диффузионной преципитации. 6. Отличие антигенов двух осадочных реакций — РА и РП. 7. Постановка и учет реакции флоккуляции.

Реакция нейтрализации (по Эрлиху, с биопробой) (РН) используется только для установления ви-

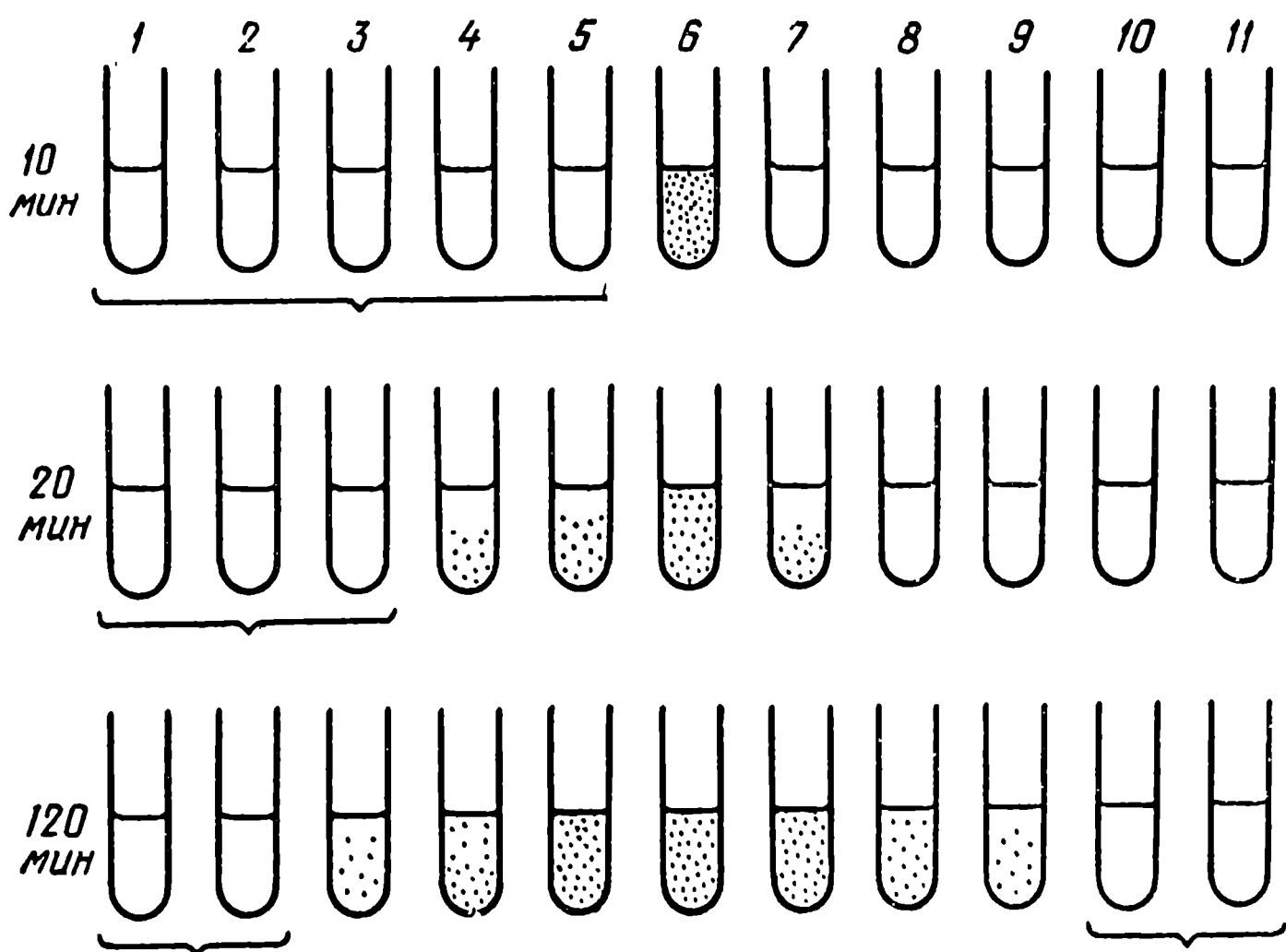


Рис. 47. Реакция флоккуляции:

быстрая реакция между антигеном и антителом (через 10 мин) в пробирке 6 (оптимальное соотношение антигена и антител); при субоптимальных количествах антигена и антител — реакция происходит позднее (через 20 мин) в пробирках 4, 5, 7. Позже (через 120 мин) реакция проявляется и в других пробирках.

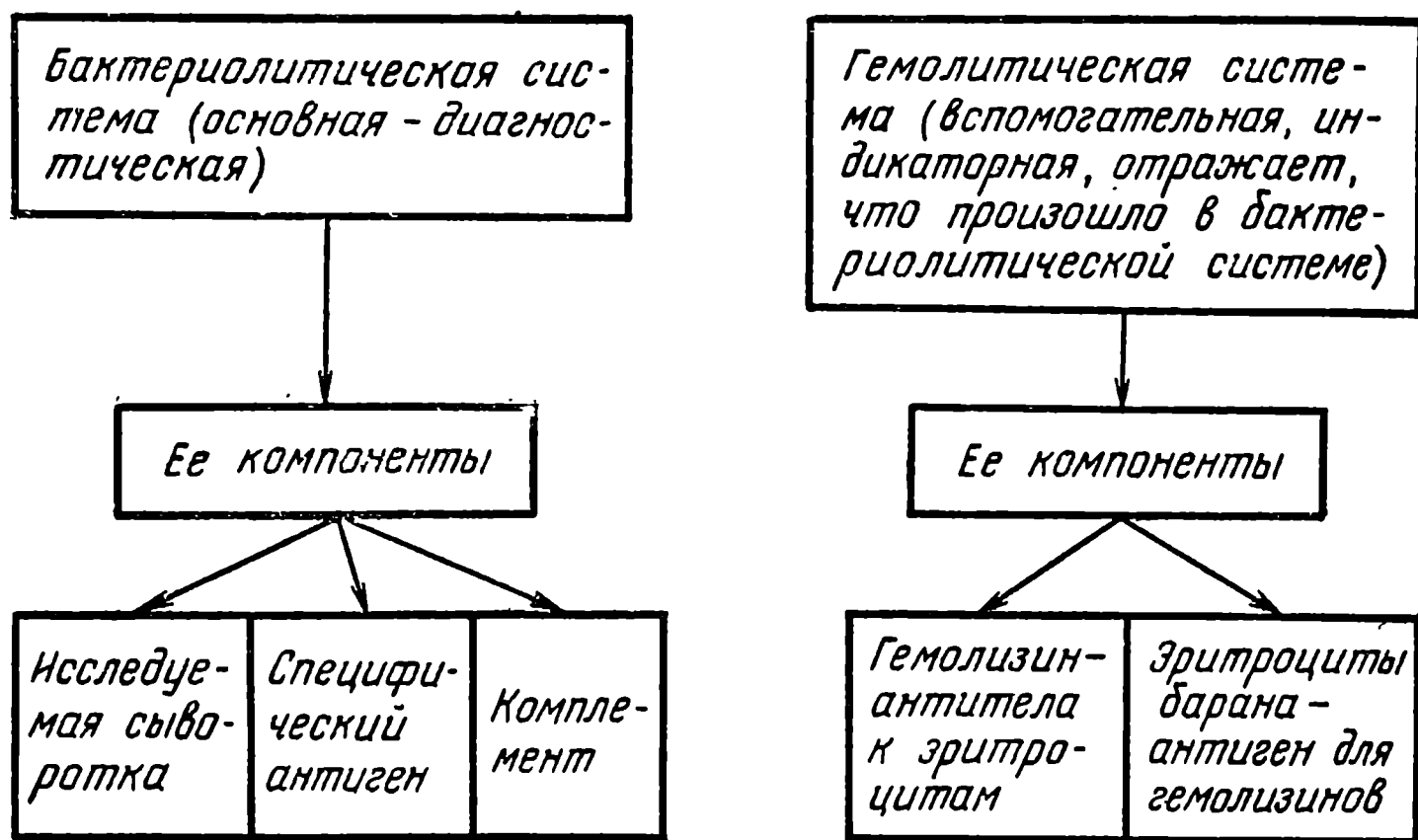
довой принадлежности бактериальных токсинов в исследуемом материале и для определения активности антитоксических сывороток. В вирусологии РН применяют для типизации некоторых вирусов с помощью специфических иммунсывороток. В пробирки с равным количеством антигена в 1 мл (например, 1000 смертельных доз столбнячного токсина) добавляют равный объем убывающего количества (убывающей концентрации) специфической гипериммунной антитоксической сыворотки. Смесь токсин-антитоксин помещают в термостат на 1—2 ч, затем из каждой пробирки смесь вводят лабораторным животным (по два животных на каждую дозу антитоксина). Животные, получившие смесь, где произошла нейтрализация токсина, остаются живыми. Наименьшее количество сыворотки, нейтрализовавшее токсин, принимается за единицу активности антитоксической сыворотки (АЕ). Чем меньше это количество, тем активнее сыворотка.

Реакция связывания комплемента (РСК) впервые описана Борде и Жангу (1901). В основу реакции легли два явления — бактериолиза и гемолиза. В их проявлении участвует комплемент. Поэтому в РСК

применяют две системы компонентов: одна обеспечивает феномен бактериолиза и используется для диагностических целей, другая — гемолитическая, индикаторная, вспомогательная, позволяющая установить, связался или не связался комплемент в первой системе. Ранее в качестве антигена брали взвесь бактерий, поэтому первая система была названа бактериолитической (в положительных случаях происходил лизис бактерий).

РСК осуществляют в два этапа. Сначала готовят бактериолитическую систему — в пробирках смешивают по 0,5 мл исследуемой сыворотки с антигеном, добавляют комплемент в строго определенной дозе (титре). Смесь антиген-сыворотка-комплемент (бактериолитическая система) помещают в водяную баню (или термостат) при 37—38° на 20—40 мин. Результат взаимодействия компонентов в пробирке невидим, жидкость остается прозрачной и бесцветной. Чтобы определить, связался ли комплемент в бактериолитической системе, нужен второй этап реакции. В пробирки добавляют компоненты гемолитической системы — отмытые эритроциты барана и инактивированную гемолитическую сыворотку, как показано в схеме.

Схема 3



Все компоненты бактериолитической системы встряхивают для перемешивания в пробирке, помещают в водяную баню при 37—38° на 20—40 мин. Затем добавляют компоненты гемолитической системы, вторично все встряхивают и вновь помещают в водяную баню на 10—15 мин.

Предварительный учет результата: если сыворотка от больного животного, то в ней содержатся антитела, которые соединяются со специфическим антигеном. С этим комплексом (антиген-антитело) связывается комплемент — гемолиза не будет, результат положительный.

Если сыворотка от здорового животного, она антител не содержит, комплекса антиген-антитело не образуется, комплемент в бактериолитической системе не свяжется. При добавлении эритроцитов и гемолизина (это между собой антиген и антитело) комплемент реагирует с этим комплексом — произойдет гемолиз, результат отрицательный.

После этого пробирки оставляют при комнатной температуре на 18—20 ч и учитывают *окончательный результат*. Если в бактериолитической системе сыворотка была от больного животного, в пробирке образуется специфический комплекс антиген-антитело, который адсорбирует (связывает) весь добавленный комплемент. Следовательно, во второй, гемолитической системе, гемолиза не произойдет, эритроциты осядут на дно пробирки, надосадочная жидкость прозрачная — результат РСК положительный. Если в исследуемой сыворотке нет специфических антител к используемому антигену (в случаях, когда сыворотка от здорового животного), в бактериолитической системе комплекс антиген-антитело не образуется и, следовательно, комплемент в данной системе не адсорбируется, он остается свободным в пробирке. При добавлении компонентов гемолитической системы (во второй фазе реакции) комплемент вступает во взаимодействие со вторым комплексом (гемолизин-эритроциты), происходит гемолиз — осадка эритроцитов не образуется, жидкость в пробирке лаково-красная. Результат РСК отрицательный.

РСК используют: 1) для обнаружения в сыворотке больного животного специфических антител (при диагностике бруцеллеза, перипневмонии, сапа, лептоспироза, трипанозомоза и др.); 2) для выявления в исследуемом материале специфического антигена (бактериального или вирусного) при наличии специфической иммунсыворотки.

Для постановки РСК необходимо иметь: пробы сывороток, поступившие для исследования; две сыворотки заведомо позитивные (стандартные, обеспечивающие положительный результат) и две нормальные сыворотки (все сыворотки в разведении 1 : 10 инактивируют при 56—58° 30 мин); антиген в разведении согласно титру; комплемент, разведенный в соответствии с установленным титром при

титрации в бактериолитической системе; гемолизин в рабочем титре; эритроциты барана 1 : 40; физиологический раствор, градуированные пипетки, пробирки, штативы, водяную баню на 37—38°.

Перед постановкой РСК кровь барана дефибринируют, эритроциты отмывают физиологическим раствором путем центрифугирования до полной прозрачности надосадочной жидкости, которую удаляют отсасыванием, а осажденные эритроциты разводят в физиологическом растворе 1 : 40 (2 : 5%). Антиген разводят согласно титру, указанному на этикетке биофабрикой. Гемолизин и комплемент перед постановкой РСК титруют.

А н т и г е н для РСК готовят на биофабриках. Обычно это экстракты разрушенных микробных взвесей (или вирусосодержащей ткани). Антигены не должны обладать гемолизирующим действием, что контролируется в процессе постановки реакции (в пробирку наливают 1—2 дозы антигена и 0,5 мл взвеси эритроцитов: гемолиза не должно быть). На ампуле с антигеном биофабрика указывает, что он специально для РСК (сапной, бруцеллезный или другой). На упаковочной коробке ставят номер серии, дату изготовления, срок годности, активность антигена, то есть, в каком разведении его надлежит использовать при постановке РСК (1 : 100, 1 : 150 и т. п.) При отдельных заболеваниях антигеном служат другие материалы. Например, для диагностики перипневмонии крупного рогатого скота антигеном для РСК служит лимфа теленка, экспериментально зараженного подкожно или интраплеврально. При длительном хранении антигенов их титр вновь проверяют в лаборатории по специальной схеме титрации.

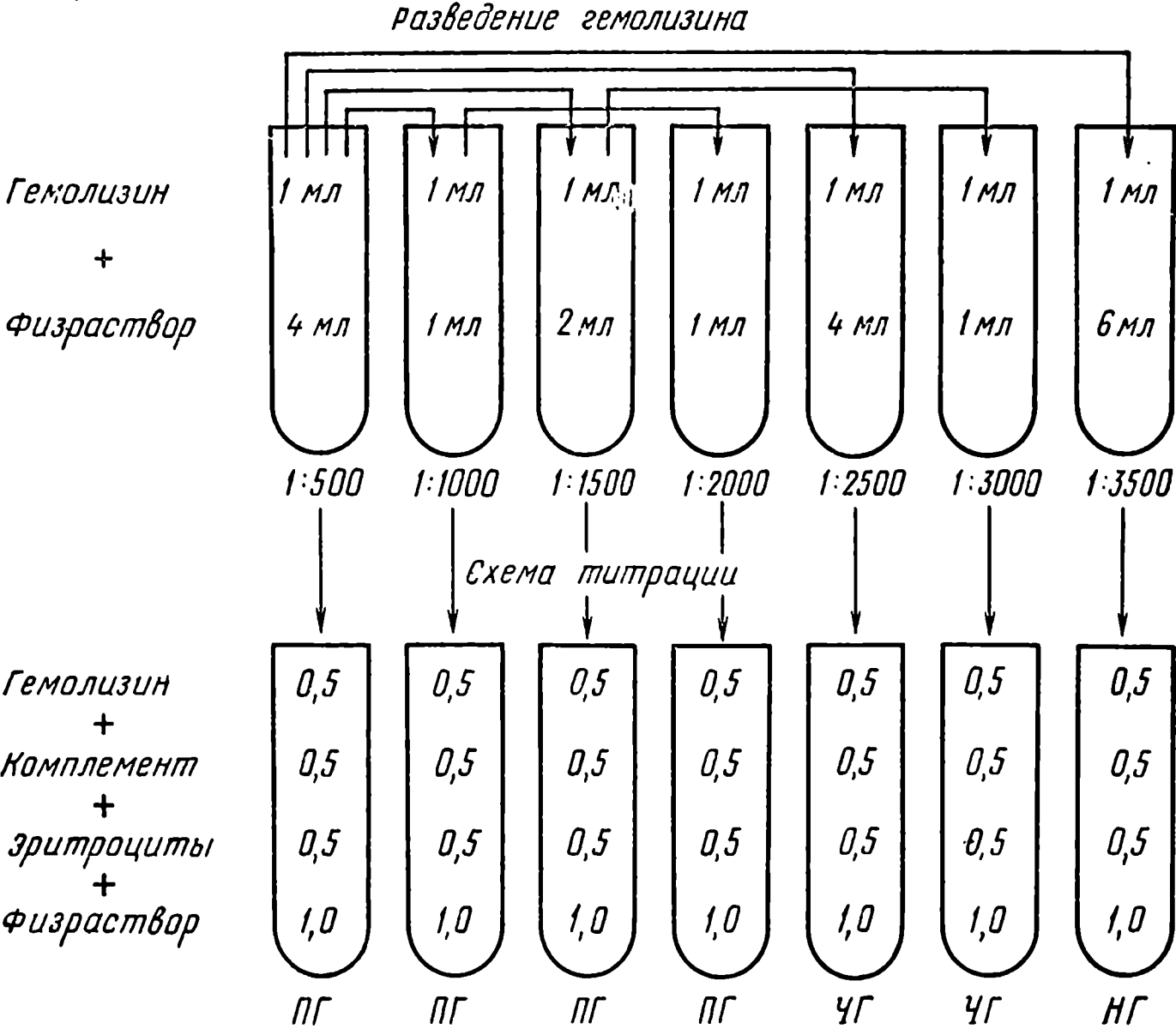
И с п ы т у е м ы е с ы в о р о т к и, поступившие для исследования, разводят физиологическим раствором 1 : 5 или 1 : 10, инактивируют прогреванием в водяной бане для разрушения собственного комплемента при 56—58° (сыворотки ослов, мулов, лошаков — при 61°) 30 мин.

Г е м о л и з и н готовят на биофабриках путем гипериммунизации кроликов отмытыми эритроцитами барана. Для этого кроликам внутривенно вводят 4—5 раз с 2—3-дневными интервалами 40—50%-ную взвесь эритроцитов. Через неделю после последней инъекции у кроликов берут кровь, стерильно отсасывают сыворотку, инактивируют ее, консервируют глицерином 1 : 1 или 0,5%-ным фенолом, титруют, разливают по ампулам. В лабораториях перед постановкой РСК вновь титруют.

Схема титрации гемолизина. Для данной реакции необходимо приготовить: 1) разведение комплемента 1 : 20; 2) гемолизин 1 : 100 (0,2 мл гемолизина + 9,8 мл физраствора); 3) взвесь эритроцитов барана 1 : 40; 4) физиологический раствор NaCl.

Для постановки реакции титрации в штативе размещают два ряда пробирок — один вспомогательный только для приготовления разведений гемолизина, второй — собственно для титрации. Только в первую пробирку вносят исходное разведение гемолизина 1: 100, затем производят последовательное разведение, как показано в схеме 4.

Схема 4



Все пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при 37—38° на 10—15 мин.

ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз; НГ — нет гемолиза. Учет результата: в данном примере наименьшее количество (или его наибольшее разведение), давшее полный гемолиз, 1 : 2000; это его фактический титр. Рабочий титр в 2 раза концентрированнее — 1 : 1000.

Каждое разведение из пробирок первого ряда переносят в отдельные пробирки второго ряда по 0,5 мл (указано стрелками). Во все пробирки второго ряда добавляют по

0,5 мл комплемента, разведенного 1 : 20, по 0,5 мл эритроцитов барана (2,5%-ная взвесь, или 1 : 40) и по 1 мл физраствора, чтобы объем жидкости в каждой пробирке составлял 2,5 мл (исходя из того, что в окончательной постановке РСК будут участвовать 5 компонентов по 0,5 мл, которые составят объем 2,5 мл; на протяжении всей работы этот объем соблюдается).

Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню на 10—15 мин. Гемолиз прежде всего произойдет в пробирках с большим содержанием гемолизина (наименьшим его разведением — 1 : 500, 1 : 1000...). Наименьшее количество гемолизина (наибольшее его разведение), вызвавшее полный гемолиз эритроцитов в данных условиях, называется *предельным* (фактическим) *титром* гемолизина. Для дальнейшей работы гемолизин используют в 2 раза концентрированное, то есть в удвоенном количестве, удвоенном титре, который называют *рабочим титром*. Например, фактический титр 1 : 2500 (или 1 : 2000), рабочий титр соответствует разведению 1 : 1250 (или 1 : 1000).

К о м п л е м е н т открыт Бухнером (1889). Это составная часть свежей сыворотки, лимфы, тканевых жидкостей разных видов животных (и человека). У насекомых комплемент отсутствует. Комплемент — вещество белковой природы, сложной структуры, быстро инактивируется при нагревании, при длительном хранении, ультрафиолетовом облучении, сильном встряхивании, фильтрации через керамические фильтры, от добавления каолина, кислот, щелочей, алкоголя, ацетона, хлороформа, дистиллированной воды, взвеси бактерий и др. Комплемент можно консервировать добавлением на 100 мл сыворотки морской свинки 5,0 сернокислого натра, 4,0 борной кислоты. Активность комплемента при этом сохраняется до полугода. Лучший способ консервирования — высушивание комплемента в условиях вакуума при низкой температуре (лиофилизация). В запаянных ампулах в таком состоянии он сохраняется два года. Перед каждой постановкой РСК активность комплемента проверяют титрованием, то есть определяют его титр — оптимальное количество, необходимое для данной реакции. Комплемент титруют дважды: в гемолитической и бактериолитической системах.

Для *титрации комплемента в гемолитической системе* готовят компоненты: комплемент в разведении 1 : 20 (1 мл комплемента + 19 мл физраствора), гемолизин, разведенный соответственно рабочему титру, взвесь отмытых эритроци-

тов барана (1 : 40), физиологический раствор. В штатив ставят пробирки и разливают в них градуированной пипеткой разное количество комплемента с интервалом 0,03 мл (0,13; 0,16; 0,19; 0,22... до 0,43 мл). Затем добавляют остальные компоненты, как указано в схеме 5.

Схема 5

Титрация комплемента в гемолитической системе

Физраствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
+ Эритроциты	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+ Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+ Физраствор	0,37	0,34	0,31	0,28	0,25	0,22	0,19
+ Комплемент	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,28	0,31

Все пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при 37—38° на 10—15 мин, затем проводят учет результата.

Физраствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
+ Эритроциты	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+ Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+ Физраствор	0,37	0,34	0,31	0,28	0,25	0,22	0,19
+ Комплемент	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,28	0,31
	НГ	НГ	НГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ

НГ — нет гемолiza; ЧГ — частичный гемолиз; ПГ — полный гемолиз.

Результат: наименьшее количество комплемента, обеспечившее полный гемолиз (в данном примере — 0,25 мл), принимают за титр комплемента.

Результат титрации начинают учитывать в пробирках с наибольшим содержанием комплемента, где прежде всего ожидается гемолиз. Наименьшее количество комплемента, обеспечившее полный гемолиз эритроцитов при данных условиях, называют *титром комплемента в гемолитической системе*.

Для *титрования комплемента в бактериолитической системе* необходимо иметь все компоненты реакции: комплемент 1 : 20, эритроциты 1 : 40, гемолизин в рабочем титре, две позитивные, две нормальные сыворотки, специфический антиген. Сыворотки разводят физраствором 1 : 10,

инактивируют при $56-58^{\circ}$ 30 мин. Каждую сыворотку разливают в два ряда пробирок по 0,5 мл. В пробирки каждого ряда добавляют комплемент в возрастающих количествах, как при титрации в гемолитической системе; начинают с количества, принятого за титр в гемолитической системе, затем в каждой последующей пробирке дозу увеличивают на 0,03 мл, выравнивая объем до 0,5 мл физиологическим раствором.

После этого в один ряд пробирок с позитивной и нормальной сыворотками добавляют по 0,5 мл антигена, во второй ряд каждой сыворотки — по 0,5 мл физиологического раствора. Все пробирки встряхивают и ставят в водяную баню на 30—40 мин. Затем во все пробирки вносят по 0,5 мл гемолизина и по 0,5 мл эритроцитов, встряхивают и вторично помещают в водяную баню на 10—15 мин. Наименьшее количество комплемента, обеспечившее полный лизис эритроцитов в обоих рядах пробирок (с антигеном и без антигена) двух нормальных сывороток, в одном ряду (без антигена) каждой позитивной сыворотки и с полной задержкой (отсутствием) гемолиза в рядах позитивных сывороток с антигеном (в тех же дозах комплемента), называют *титром комплемента*, который используется в постановке главного опыта РСК при диагностических исследованиях.

Главный опыт РСК (собственно диагностическое исследование). В штативы ставят два ряда пробирок по количеству исследуемых проб сывороток. Каждую инактивированную сыворотку наливают в две пробирки по 0,5 мл; в одну добавляют антиген 0,5 мл, в другую (без антигена) — 0,5 мл физраствора и, добавив комплемент, составляют бактериолитическую систему, а затем добавляют гемолитическую, как указано в схеме 6.

Схема (6) постановки главного опыта РСК. Необходимые компоненты: 1) исследуемая сыворотка, инактивированная, разведенная физиологическим раствором 1 : 10; 2) специфический антиген, разведенный согласно титру, указанному биофабрикой на этикетке упаковки; 3) комплемент в установленном титре; 4) гемолизин в рабочем титре; 5) взвесь отмытых эритроцитов барана 1 : 40; 6) физиологический раствор NaCl. Исследуемые сыворотки разливают в два ряда пробирок. Для любого количества исследуемых сывороток в качестве контроля используют заведомо позитивную сыворотку (дающую положительный результат) и нормальную (от здорового животного, дающую отрицательный результат).

Схема 6

Ряд пробирок с антигеном

Исследуемая сыворотка	0,5	Позитивная сыворотка	0,5	Нормальная сыворотка	0,5
+					
Антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+					
Комплемент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Пробирки с компонентами бактериолитической системы встряхивают, помещают в водяную баню на 20—40 мин при 37—38°.

Ряд пробирок без антигена

Исследуемая сыворотка	0,5	0,5	0,5
+			
Физраствор	0,5	0,5	0,5
+			
Комплемент	0,5	0,5	0,5

Пробирки бактериолитической системы второго ряда без антигена встряхивают, помещают в водяную баню при тех же условиях. Затем во все пробирки первого и второго ряда добавляют компоненты гемолитической системы, вторично помещают в водяную баню на 10—15 мин.

Результат:

Исследуемая сыворотка	0,5	Позитивная сыворотка	0,5	Нормальная сыворотка	0,5
Антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	+ или -	+ (нет гемолиза)	- (полный гемолиз)		

В пробирках второго ряда без антигена везде полный гемолиз.

Для окончательного результата пробирки оставляют при комнатной температуре на 18—24 ч. Во всех пробирках без

антигена, независимо от больного или от здорового животного получена сыворотка, должен быть гемолиз; в пробирках первого ряда с антигеном более четкий результат выражен при отстаивании.

Показания реакции в пробирках с испытуемыми сыворотками считают достоверными, если в пробирках с позитивными сыворотками и антигеном гемолиз отсутствует при полном гемолизе в пробирках с позитивной сывороткой без антигена и во всех пробирках с заведомо нормальной сывороткой.

Данная реакция должна сопровождаться контролями антигена, комплемента, гемолизина, эритроцитов. Для этого в отдельные пробирки наливают антиген с эритроцитами барана; комплемент с эритроцитами без гемолизина; гемолизин с эритроцитами без комплемента; эритроциты и физиологический раствор. Объем в каждой пробирке доводят физраствором до 2,5 мл. Пробирки встряхивают, помещают в водяную баню при 37° на 20 мин. Во всех контрольных пробирках гемолиза не должно быть.

Результат РСК принято выражать в «крестах». ++++ (≠) — полное осаждение эритроцитов (нет гемолиза), жидкость над осадком бесцветная. +++ (≡) — жидкость над осадком едва заметно окрашена в желтоватый цвет — это показатели положительного результата реакции. Наличие осевших на дне эритроцитов и частичное окрашивание надосадочной жидкости за счет лизиса некоторой части эритроцитов обозначают ++ (≡) и ++— (≡), то есть два и два с половиной креста означает сомнительный результат реакции. Резко выраженный гемолиз (без осадка) или с небольшим осадком (+) — отрицательный результат.

При массовых серологических исследованиях пользуются автоматической пипеткой Флоринского (рис. 48, 49).

Реакция длительного связывания комплемента (РДСК) предложена Якобшталем (1910) как более эффективная по чувствительности в отличие от обычной классической РСК. Суть реакции заключается в том, что бактериолитическую систему выдерживают при трех различных температурных режимах: после смешения компонентов — при комнатной температуре 15 мин, затем при низкой температуре (на холоде +4°) в рефрижераторе 18—20 ч и в водяной бане 15 мин. После этого добавляют гемолитическую систему, встряхивают, вновь помещают в водяную баню и производят

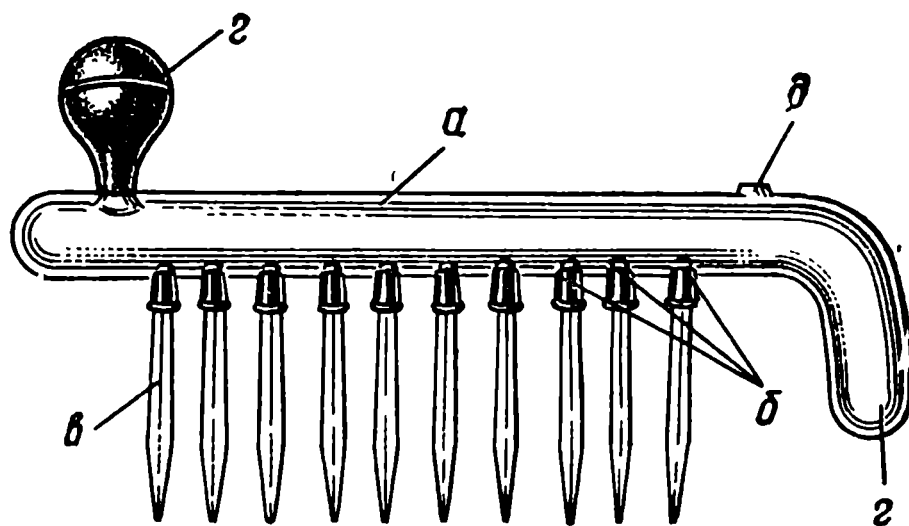


Рис. 48. Групповая автоматическая пипетка Флоринского:

a — стеклянный цилиндр; *б* — отверстия в нижней части цилиндра; *в* — пипетки-мерники; *г* — приемник для избыточной жидкости; *д* — отверстие для слива избыточной жидкости; *з* (вверху) — резиновая груша.

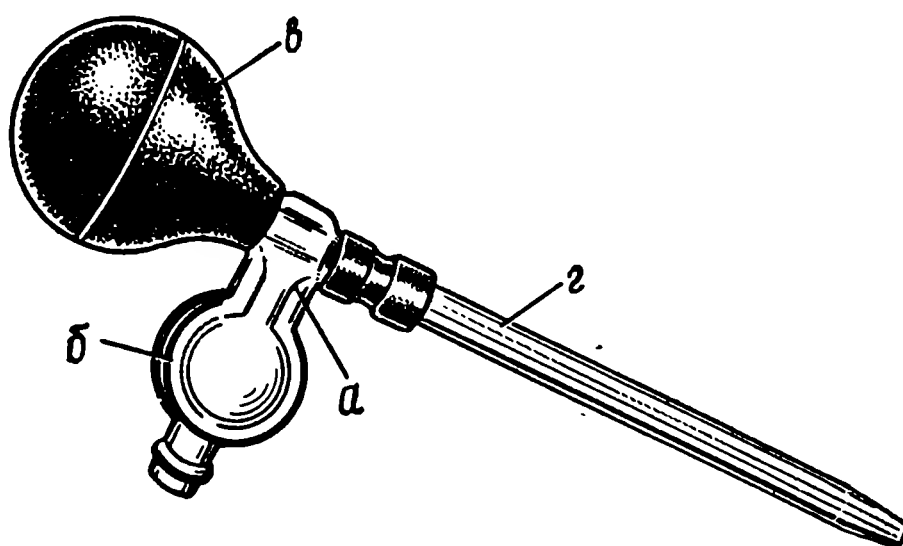


Рис. 49. Одиночная автоматическая пипетка Флоринского:

a — стеклянный патрубок; *б* — расширение для сбора избыточной жидкости; *в* — резиновая груша; *г* — пипетка-мерник.

учет реакции, как обычно при РСК. Многими исследователями подтверждена эффективность РДСК при диагностике ряда инфекционных болезней (туберкулез, вибриоз, бруцеллез и др.).

Вопросы для самопроверки. 1. Постановка реакции нейтрализации и ее практическое использование. 2. Сущность РСК. Какие системы участвуют в РСК? 3. Гемолизин, принцип его получения и титрации, установление рабочего титра гемолизина. 4. Комплемент, его свойства, определение его активности (титр). 5. Почему необходимо инактивирование исследуемых сывороток? 6. Какой результат РСК означает гемолиз? Отсутствие гемолиза? 7. Методика постановки РДСК.

Реакция подавления связывания комплемента (РПСК), или реакция торможения, непрямая РСК. В данной реакции участвует еще один компонент — стандартная иммунная сыворотка, содержащая антитела к антигену, используе-

тому обычно для диагностики и, следовательно, положительно реагирующая в классической РСК.

Исследуемую сыворотку смешивают с антигеном и некоторое время выдерживают без комплемента, затем добавляют комплемент и стандартную сыворотку, пробирки встряхивают и помещают в водяную баню на 20—30 мин, после чего добавляют гемолитическую систему и вновь ставят в водяную баню. Если нет гемолиза — результат отрицательный потому, что испытуемая сыворотка не реагировала с антигеном и последний вступил в реакцию со стандартной сывороткой, связав комплемент. Если исследуемая сыворотка от больного животного, она содержит специфические антитела по отношению к антигену, происходит реакция между антигеном и антителами, *не связывая комплемента*. Антиген, занятый антителами исследуемой сыворотки, не вступает в реакцию (подавляется) со стандартной (заведомо известной специфической) сывороткой, комплемент остается свободным и вступает в реакцию в гемолитической системе — происходит гемолиз, результат реакции положительный по отношению к исследуемой сыворотке.

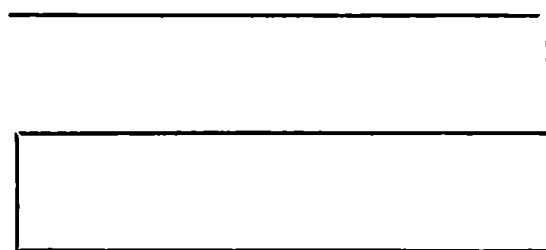
Вопросы для самопроверки. 1. Сущность реакции подавления связывания комплемента. 2. Почему гемолиз в данной реакции считают положительным результатом?

О п с о н о - ф а г о ц и т а р н а я р е а к ц и я (ОФР) основана на учении И. И. Мечникова, установившего, что естественная резистентность организма животного к действию микроорганизмов связана с фагоцитарной активностью некоторых групп лейкоцитов, названных им фагоцитами. Способность живых клеток поглощать проникающие в него инородные частицы, в том числе микробы, и переваривать их носит название *фагоцитоза*. Количество микроорганизмов, которое может быть фагоцитировано клеткой, непостоянно и колеблется от единичных до нескольких десятков.

Иммунитет сопровождается повышением фагоцитарной активности лейкоцитов к возбудителю болезни, зависит это от наличия в сыворотке крови антител — *опсопинов*. Последние, воздействуя на фагоцитируемый объект, изменяют его, «подготавливают» к поглощению и перевариванию. Лейкоциты, отмытые от сыворотки, теряют свою фагоцитарную способность. При добавлении свежей сыворотки эта способность вновь восстанавливается. Количество опсопинов в крови, следовательно и фагоцитарная активность лейкоцитов, повышается при иммунизации животных и бла-

гоприятно влияет на исход инфекционного процесса. Снижение уровня опсонинов в крови инфицированного животного свидетельствует о снижении сопротивляемости организма. Следовательно, по степени выраженности ОФР можно судить о состоянии защитных сил макроорганизма. ОФР нашла свое применение в диагностике и прогнозировании болезни.

П о с т а н о в к а О Ф Р: в центрифужную пробирку наливают и тщательно перемешивают 0,25 мл 2%-ного раствора лимоннокислого натрия и 0,25 мл исследуемой крови больного животного. В эту смесь добавляют 0,25 мл двухмиллиардной взвеси бактерий, прогревают 30 мин в водяной бане (или термостате) при 37°, центрифугируют и отсасывают пастеровской пипеткой верхний слой осадка, состоящий из лейкоцитов. На хорошо обезжиренных стеклах делают мазки, их высушивают, фиксируют смесью Никифорова (смесь спирта и эфира в одинаковых количествах) в течение 20 мин, затем окрашивают по методу Романовского — Гимза или синькой Мансона. Мазки микроскопируют, определяя количество бактерий, фагоцитированных 50 (или 100) нейтрофилами в нескольких полях зрения. Чтобы не считать одни и те же клетки, пользуются крестообразным столиком с делениями, позволяющими передвигать препарат, меняя поле зрения следующим образом:



Частное от деления общего количества фагоцитированных бактерий на 100 (или 50) лейкоцитов (то есть на число сосчитанных лейкоцитов) называют *фагоцитарным числом*. Например, при подсчете фагоцитированных бактерий в 100 лейкоцитах оказалось 720 микробных клеток. В данном примере фагоцитарное число $= 720 : 100 = 7,2$.

В некоторых случаях необходимо иметь суждение об уровне опсонинов в сыворотке крови. Для этого определяют *опсонический индекс*, то есть показатель от деления фагоцитарного числа иммунной сыворотки (или сыворотки больного) на фагоцитарное число нормальной сыворотки. Для вычисления опсонического индекса необходимо поставить две ОФР: 1) отмытые лейкоциты здорового животного + + микробная взвесь + сыворотка больного животного;

2) такие же лейкоциты и микробная взвесь + сыворотка здорового животного. Например, если в 100 лейкоцитарных клетках с нормальной сывороткой обнаружено 210 фагоцитированных бактерий, фагоцитарное число будет $210 : 100 = 2,1$. В 100 лейкоцитах с исследуемой сывороткой фагоцитировано 630 бактерий — фагоцитарное число данной пробы сыворотки составит $630 : 100 = 6,3$. Опсонический индекс равен $\frac{6,3}{2,1} = 3$. Если индекс больше единицы, это значит, что в испытуемой сыворотке содержится больше опсопинов, чем в контрольной нормальной сыворотке. Полученный результат указывает на благоприятный прогноз в исходе инфекционного процесса.

Вопросы для самопроверки. 1. Какую роль выполняют опсопины в организме? 2. Что такое фагоцитарное число и как его определить? 3. Методика выполнения ОФР, показатели для учета ее результата. 4. Значение опсонического индекса, как его вычислить?

Метод флюоресцирующих антител (МФА). Возможности данного метода определяются специфичностью первой фазы серологических реакций с высокой чувствительностью люминесцентного анализа. Для осуществления МФА необходимо иметь высокоспецифические иммунные люминесцирующие сыворотки. Известно, что в различных серологических реакциях, используемых в микробиологической практике, участвуют преимущественно три компонента: бактериальный антиген, антитело и комплемент. Все три компонента являются антигенами в широком смысле слова и против каждого из них могут быть получены иммунные сыворотки и, соответственно, люминесцирующие антитела. В зависимости от того, какого типа люминесцирующую сыворотку мы используем (против бактериального антигена, антибактериальных антител, комплемента), различают три основных варианта метода флюоресцирующих антител: прямой (1) и непрямой (2) варианты и модификация непрямого варианта с использованием комплемента.

Иммунологическая реакция между антигеном и антителом осуществляется в этих модификациях непосредственно на предметном стекле. Для фиксации микроорганизмов применяют органические растворители: ацетон, этанол, метанол, диоксан, а также обычные фиксаторы, используемые в микробиологической практике: формалин, смесь Никифорова, жидкость Карнуа и др.

Прямой вариант (Coons, Caplan, 1950). На готовый препарат наносят специфическую люминесцирующую сыворотку на определенное время, затем излишек сыворотки сливают, препарат промывают и просматривают в люминесцентном микроскопе. Этот метод применяют для обнаружения бактерий в патологическом материале, объектах внешней среды, а также для идентификации возбудителей заболеваний в культурах.

Непрямой (двухступенчатый) вариант (Weller, Coons, 1954). На первом этапе происходит специфическое соединение антигена с соответствующим антителом немеченой сыворотки. На втором этапе специфическое немеченое антитело связывается с антивидовым люминесцирующим антителом, содержащимся в сыворотке животного, иммунизированного глобулинами (или цельной сывороткой крови) того вида животных, от которых была использована иммунная сыворотка.

Непрямой антикомплементарный (трехступенчатый) вариант (Goldwasser, Shepard, 1958). Первый этап — на комплекс антиген — немеченое антитело наслаивают нормальную сыворотку, содержащую комплемент (второй этап). Затем комплекс антиген-антитело-комплемент обрабатывают люминесцирующей антикомплементарной сывороткой, приготовленной при иммунизации кроликов сывороткой того вида животного, которое служило источником комплемента (третий этап). Указанные непрямые варианты МФА можно использовать как для выявления антигенов, так и для определения антител. Кроме того, для постановки двухступенчатого варианта нужно иметь ограниченный набор антивидовых люминесцирующих сывороток (против глобулинов быка, барана, лошади, свиньи и др.), а для антикомплементарного варианта достаточно иметь всего одну люминесцирующую сыворотку против глобулинов морской свинки.

МФА имеет ряд преимуществ перед классическими приемами бактериологических и серологических исследований:

1) МФА является экспресс-методом, позволяющим провести исследования в течение 2—3 ч, так как первая фаза серологических реакций протекает в течение нескольких минут;

2) МФА позволяет наблюдать реакцию специфического связывания антигенов бактерий с антителами на одной микробной клетке, что говорит о высокой чувствительности метода. Его достоверность основывается на совме-

щении специфичности серологических реакций с возможностями световой микроскопии;

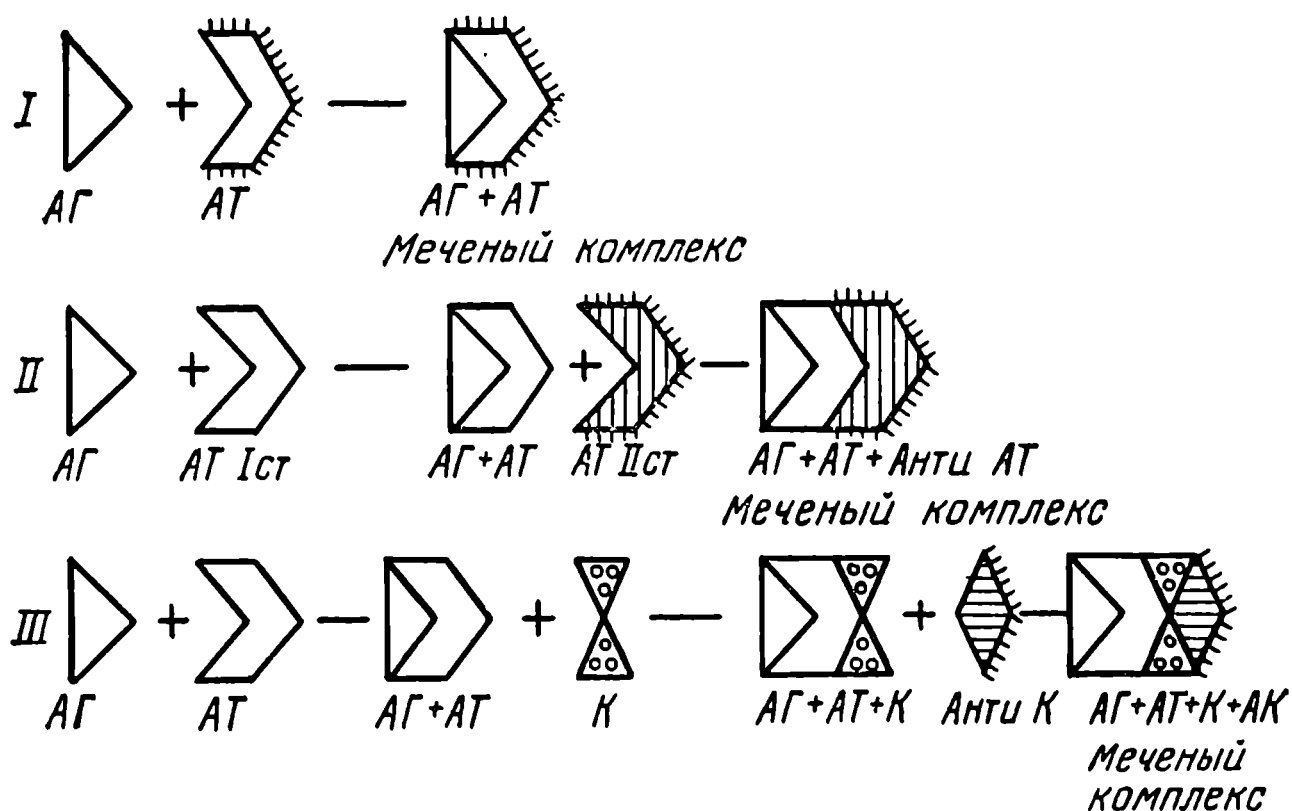
3) идентификацию можно проводить в нативном материале (органы, ткани животных, различные субстраты внешней среды). При этом отпадает необходимость выделения чистой культуры патогенного микроорганизма;

4) как метод серологической диагностики иммунолюминесценция позволяет обнаружить специфические антитела независимо от их характеристик в других серологических реакциях (агглютинирующие, комплементсвязывающие, неполные и др.).

Методика проведения иммунолюминесцентной микроскопии. В практике ветеринарных бактериологических лабораторий используют люминесцирующие сыворотки биофабричного производства. В зависимости от типа флюорохрома люминесцирующие сыворотки обеспечивают либо зеленое свечение объекта (краситель на основе флюоресцеина), либо красное (краситель на основе родамина).

Для проведения иммунолюминесцентной микроскопии следует на тонкое обезжиренное без царапин предметное стекло нанести исследуемый материал. При исследовании органов и тканей животных готовят препараты-отпечатки тонким слоем. Препараты подсушивают на воздухе и помещают в фиксирующую жидкость (этанол — 15 мин, метанол — 5 мин, ацетон — 5 мин). Если необходимо, после фиксации препараты некоторое время можно сохранять в холодильнике. Последовательность и характер дальнейших процедур зависят от применяемого варианта МФА (одноступенчатый, двухступенчатый, трехступенчатый) (рис. 50, I, II, III). Обработку препаратов люминесцирующими сыворотками, а также немечеными сыворотками первой ступени и комплементом проводят при 37° в условиях влажной камеры (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой).

Одноступенчатый вариант — на предметное стекло с фиксированным исследуемым материалом наносят люминесцирующую сыворотку (в разведении, указанном на ампуле). Препарат помещают во влажную камеру при 37° на 15—20 мин. Затем его промывают забуференным физиологическим раствором (рН 7,4) в сосуде, меняя раствор через 5—10 мин несколько раз. Промывать препараты можно под струей водопроводной воды в течение 3—5 мин. Вода должна быть нейтральной и не содержать железа.



Условные обозначения: АГ-антиген, АТ-антитело, АТ I ст - иммунная сыворотка, АТ II ст - люминесцирующая антивидовая сыворотка, К-комплемент,  - меченое антитело

Рис. 50. Схема вариантов метода флуоресцирующих антител.

Затем препарат (на одном стекле может быть несколько мазков) подсушивают на воздухе или фильтровальной бумагой, после чего наносят каплю забуференного глицерина рН 8,0 и покрывают покровным стеклом. На покровное стекло наносят иммерсионную нефлуоресцирующую жидкость и микроскопируют.

Двухступенчатый вариант — на предметное стекло с исследуемым материалом наносят каплю иммунной немеченой сыворотки первой ступени. Препарат помещают в термостат в условиях влажной камеры на 15—20 мин. Затем его промывают, как описано выше, подсушивают и наносят каплю люминесцирующей антивидовой сыворотки. Препарат снова помещают в термостат в условиях влажной камеры на 15—20 мин. Повторяют процедуру промывания и высушивают фильтровальной бумагой. Наносят забуференный глицерин, покрывают покровным стеклом и наносят нефлуоресцирующую иммерсионную жидкость, микроскопируют.

Трехступенчатый вариант (антикомплементарный) — на предметное стекло с исследуемым материалом наносят каплю иммунной немеченой сыворотки первой ступени. Препарат помещают в термостат, как описано выше, подсушивают и на мазок наносят каплю комплемента. Препарат вновь помещают во влажную камеру и в термостат на 15—20 мин,

после чего промывают и наносят люминесцирующую антикомплементарную сыворотку. Последующие процедуры аналогичны одноступенчатому варианту.

Приготовление и обработка контрольных препаратов. 1. *Для прямого варианта* с целью определения специфичности реакции между антигеном с люминесцирующей сывороткой следует этой же сывороткой обработать препараты-мазки из гетерологичных видов микробов. Эти виды должны быть близкие в антигенном отношении, но отличающиеся по морфологии от исследуемых микроорганизмов; и далекие в антигенном отношении к исследуемым микроорганизмам, но сходные по морфологии и распространению с ними. Препараты-отпечатки обрабатывают люминесцирующей нормальной сывороткой.

2. *Для непрямого варианта* необходимо иметь три контрольных препарата обработанных: 1) нормальной сывороткой, 2) люминесцирующей антивидовой сывороткой без иммунной немеченой сыворотки и 3) люминесцирующей антивидовой сывороткой с заведомо иммунной сывороткой первой ступени.

3. *Для непрямого варианта с компонентом* обязательными контрольными препаратами являются препараты, при обработке которых иммунная сыворотка заменена нормальной сывороткой того же вида и в тех же разведениях; препараты, обработанные всеми ингредиентами, кроме иммунной сыворотки.

При оценке результатов необходимо учитывать яркость и цвет, локализацию и структуру свечения. Бактерии, окрашенные люминесцирующей сывороткой, меченой изотиоцианатом флюоресцеина, имеют яркое зеленое свечение по периферии в виде ободка или ореола, центральная часть бактерий светится слабо. Такое свечение называется специфическим в отличие от неспецифического, когда все тело клетки светится равномерно. Чем более выпукло лежит бактериальная клетка в препарате, тем резче ободок. Объяснить такое свечение можно тем, что с единицы площади «периферии» клетки на сетчатку глаза наблюдателя проецируется в несколько раз больше антител, чем с центральной части клетки микроба. Следует иметь в виду, что у пластичных клеток (лептоспиры, вибрионы) нет контура или он заметен слабо. У клеток, погруженных в тканевую жидкость, и у молодых бацилл сибирской язвы контур обычно выражен нерезко.

Интенсивность свечения оценивают по четырехкрестовой системе: ++++ — очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; +++ — яркая флуоресценция периферии клетки; ++ — слабое свечение периферии клетки; + — нет контрастного свечения периферии и тела микробной клетки.

Отсутствие специфического свечения обозначают минусом (видны тени микроорганизмов). При диагностике различных возбудителей положительным результатом чаще всего считают специфическое свечение бактериальных клеток не ниже чем на четыре или на три креста.

Вопросы для самопроверки. 1. Сущность метода флуоресцирующих антител. 2. Варианты МФА, их принципиальное отличие, недостатки и преимущества. 3. Условия постановки МФА во всех модификациях. 4. Контроли, необходимые при использовании МФА. 5. Учет и оценка результатов МФА.

ВОЗБУДИТЕЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ (МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА)

СТАФИЛОКОККИ

Стафилококки — *Staphylococcus* — были выделены Пастером в 1860 г. Как возбудителей нагноительных процессов их впервые изучал Розенбах (1861). Стафилококки относятся к порядку Eubacteriales, семейству Micrococcaceae. Прежде род стафилококков подразделяли на три вида, отличающихся по пигментообразованию: *St. albus*, *St. aureus*, *St. citreus* (*S. flavus*); однако в практике встречаются и стафилококки, образующие кремовый и серый пигменты. По современной классификации их разделяют на три вида по патогенности: 1) *St. aureus* — независимо от образуемого пигмента — патогенные; 2) *St. epidermidis* — условно-патогенные, постоянные обитатели кожи и слизистых; 3) *St. saprophyticus* — непатогенные стафилококки. Среди всех видов этого рода наблюдают штаммы, которые вызывают у животных и человека различные нагноительные процессы — фурункулы, карбункулы, флегмоны, панариции, гнойное воспаление ран, абсцессы, сепсис, септикопиемию. Получил широкое распространение стафилококковый мастит коров. Патогенные штаммы стафилококков, попадая в желудочно-кишечный тракт человека, вызывают пищевую токсикоинфекцию. Сапрофитные стафилококки, обладающие гнилостными свойствами, вызывают порчу сырья и пищевых продуктов.

М а т е р и а л д л я м и к р о б и о л о г и ч е с к о г о и с с л е д о в а н и я. В лабораторию посылают асептически взятый гной, содержимое ран, язв, карбункулов, при подозрении на сепсис — кровь. При пищевых токсикоинфекциях исследуют рвотные массы, остатки пищи, смывы с посуды. Исследуют пробы комбикорма, а при мастите — паренхимное молоко.

С х е м а м и к р о б и о л о г и ч е с к о г о и с с л е д о в а н и я включает: микроскопию препаратов-мазков из присланного материала, посев на питательные среды и

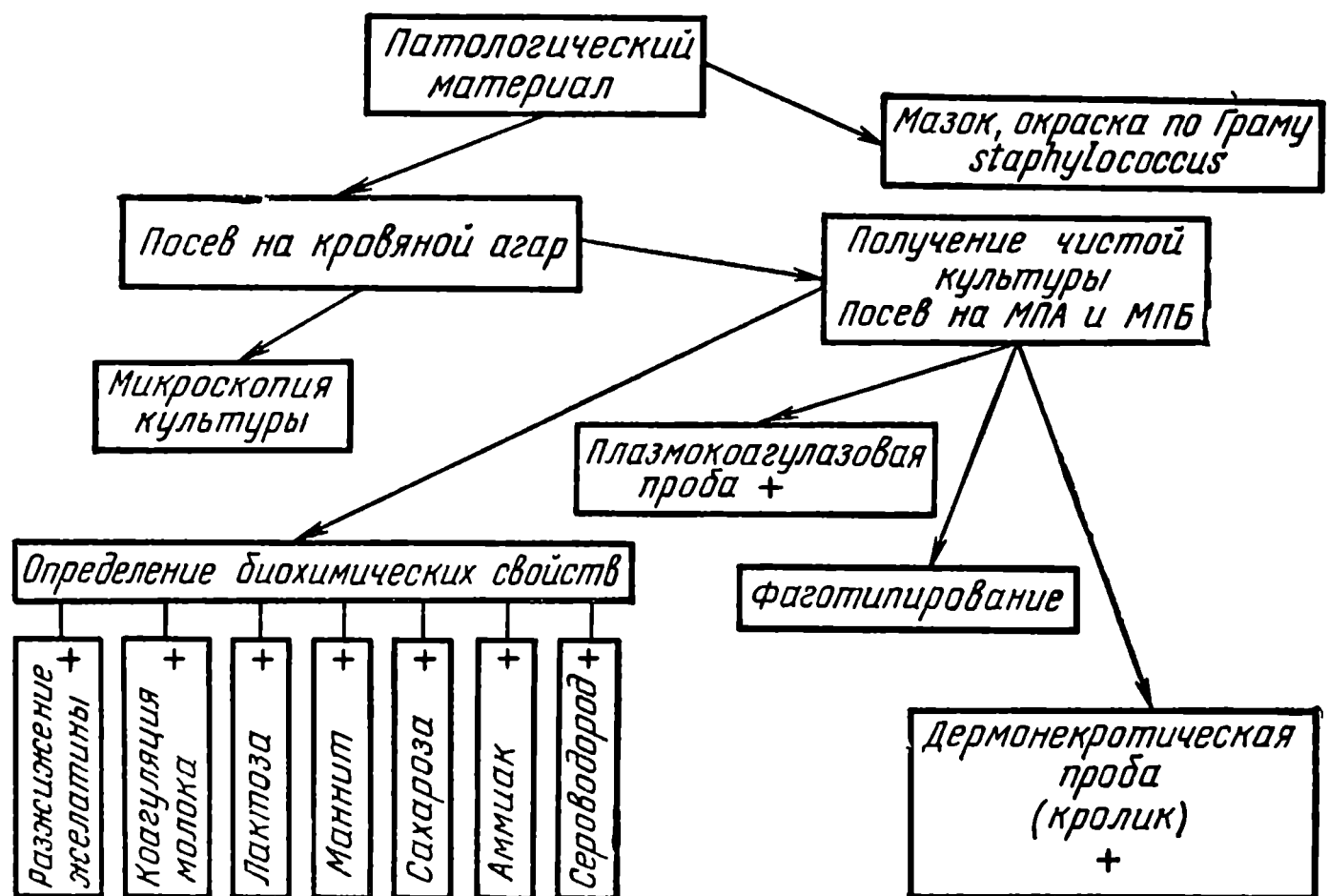


Рис. 51. Схема исследования патологического материала при стафилококковой инфекции.

выделение чистой культуры стафилококка, определение ее патогенности, антибиотикорезистентности и, при необходимости, фаготипа (рис. 51).

Стафилококки — шаровидные грамположительные микроорганизмы, располагающиеся скоплениями в виде кучек или виноградных гроздьев. Неподвижны. Споры и капсулы не образуют. Хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красителями. Грамположительная способность окраски может утрачиваться под воздействием антибиотиков, сульфамидных препаратов и других факторов. Обнаружение стафилококков в мазке из крови, гноя, раневого содержимого дает основание для постановки диагноза на стафилококковую инфекцию. В других случаях результат микроскопирования является ориентировочным.

Культурально-биохимические свойства. Стафилококки аэробы, факультативные анаэробы. Хорошо растут на обычных питательных средах при pH 7,2—7,8. Подщелачивание среды до pH 8,0—8,6 заметного влияния на рост микроба не оказывает, но при понижении pH рост замедляется и при pH 5,6—5,8 прекращается. Среди неспорообразующих микробов стафилококки наиболее устойчивы к различным физическим и химическим воздействиям, что дает возможность использовать их как тест-микробов при изучении эффективности дезинфицирующих веществ.

Стафилококки галлофилы растут на среде с концентрацией хлорида натрия до 8—10%. В МПБ образуют обильное помутнение и слизистый осадок. На МПА — крупные круглые с ровными краями и умеренно выпуклой глянцевой поверхностью колонии. На плотной среде стафилококки образуют нерастворимые в воде липохромные пигменты — белый, лимонно-желтый и золотистый. Пигментообразование лучше протекает при рассеянном свете и обильной аэрации. Чистую культуру стафилококка можно получить после посева исследуемого материала на 5%-ный кровяной агар с последующей отливкой типичной колонии. В качестве селективной среды для выделения только стафилококков используют МПА с 8—10% хлорида натрия и 5% дефибринированной крови. Некоторые штаммы при этом проявляют четкую зону гемолиза, но большинство из них обладает потенциальной гемолитической способностью, что можно выявить, применив специальную методику.

Лизис эритроцитов может быть обусловлен разными типами гемотоксинов бактерий — α , β , γ , Δ и др. Это экзотоксины, обладающие антигенными и иммуногенными свойствами. Экзотоксинам стафилококков свойственно также летальное и некротизирующее действие. Эндотоксины стафилококков обладают высокой термостабильностью (100° свыше 30 мин) и выраженным энтеротоксическим действием. МПЖ и свернутую сыворотку они разжижают, свертывают и пептонизируют молоко. Ферментируют многие углеводы. Считают, что штаммы стафилококка, сбраживающие маннит, являются патогенными. Однако маннитферментативная способность микроба (как и образование пигмента) нестабильна.

Для правильного суждения об этиологической роли стафилококков требуется выделить его из исследуемого материала и детально изучить несколько (иногда до 50) колоний, так как многие патогенные штаммы могут не образовывать золотистого пигмента и не вызывать гемолиз на кровяном агаре при обычных условиях. Поэтому чистые культуры стафилококков проверяют по их способности ферментировать маннит, коагулировать цитрированную плазму, выделять фибринолизин и лецитиназу, ДНК-азу, обладать скрытой (потенциальной) гемолитической способностью. Для более полной характеристики патогенных штаммов определяют у них способность выделять дермонекротоксин, токсин общего действия и энтеротоксин.

Ферментацию маннита стафилококками определяют путем посева его на МПБ, содержащий 0,5% маннита, индикатор Андрэдэ и газовки. После 1—2-суточной инкубации при 37° среда с патогенным штаммом микроба краснеет, в газовках иногда скапливаются пузырьки газа. Это свойство хорошо выявляется на полужидкой среде с теми же компонентами.

Плазмокоагулязную активность определяют в специальной реакции — плазмокоагуляции (РПК). Для постановки ее необходимо иметь молодые культуры стафилококков и для контроля — заведомо коагулирующий и некоагулирующий штаммы микробов, нативную или сухую цитратную плазму кролика.

Плазму получают от кролика весом 1,5—2 кг, фиксированного в спинном положении. Кровь берут из сердца в количестве 8 мл иглой, надетой на шприц, промытый внутри 5%-ным раствором лимоннокислого натрия. Ее осторожно сливают в пробирку с 2 мл 5%-ного раствора лимоннокислого натрия и осторожно перемешивают. Кролику же вводят подкожно 8 мл стерильного физиологического раствора. Пробирку с кровью выдерживают при +4° до осаждения эритроцитов. Для ускорения работы цитратную кровь можно центрифугировать при 1500—2000 об/мин. Надосадочная жидкость — это и есть плазма. Срок ее годности при хранении в холодильнике 4—5 дней.

Перед постановкой реакции отсасывают необходимое количество плазмы, разводят ее физиологическим раствором 1 : 5, разливают в пробирки по 0,5 мл и вносят в них по 0,5 мл бульонной культуры. При исследовании культур, выращенных на плотной среде, плазму разводят 1 : 10, разливают в пробирки по 1 мл и диспергируют в ней 1 петлю агаровой культуры стафилококка. В обоих случаях пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37°. Учет производят через 1, 2, 3 и 24 ч. Наличие плотного или желеобразного сгустка указывает на положительный результат реакции. Для признания штамма патогенным срок наступления реакции на учитывают.

Для выявления *фибринолитической* способности стафилококков пробирки с положительными результатами плазмокоагулирования оставляют в термостате на несколько суток. При наличии фибринолизина коагулированная плазма разжижается.

Способность стафилококков *продуцировать лецитиназу* определяют разными методами. Наиболее доступен из них

следующий: к расплавленному и остуженному до 50—60° МПА добавляют взбитые яичные желтки, хорошо размешивают их и выливают в чашки Петри. После застывания (затвердения) среды производят посев испытуемых культур. При росте на этой среде лецитиназоположительные штаммы стафилококков через 24—48 ч образуют вокруг колонии зону помутнения, окруженную радужным венчиком.

Скрытую (потенциальную) гемолитическую способность стафилококков выявляют на 5%-ном кровяном МПА. Для этого бактериологической петлей по диаметру чашки делают прямой полоской посев бета-гемолитического штамма стафилококка. Затем перпендикулярно этой полоске с двух сторон высевают по 4—5 испытуемых штаммов стафилококков. После суточного инкубирования при 37° некоторые негемолитические штаммы в непосредственной близости к высеянному по диаметру бета-гемолитическому штамму стафилококка образуют зону четко выраженного гемолиза.

Для определения *ДНК-азной активности* стафилококков необходимо иметь МПА с рН 8,4—8,6, раствор натриевой соли ДНК (20 мг/мл) в стерильной дистиллированной воде, к которому добавлено несколько капель 2%-ного едкого натрия (можно хранить при +4° до 40 дней), хлористый кальций (раствор, используемый для инъекций), 1 н. раствор соляной кислоты.

К расплавленному и несколько охлажденному МПА добавляют раствор натриевой соли ДНК из расчета 1—1,5 мг/мл и стерилизуют в водяной бане кипячением 30—40 мин. После охлаждения среды до 50—60° к ней асептично добавляют хлористый кальций из расчета 0,8 мг/мл, разливают в чашки Петри по 10—15 мл. На поверхность застывшей среды после ее подсушивания высевают прикосновением петли в заранее размеченные точки 8—10 испытуемых культур стафилококка и инкубируют при 37° 18—20 ч. Затем в чашку вносят 4—5 мл 1 н. раствора соляной кислоты, которую через 2—3 мин сливают. Результат реакции учитывают, просматривая чашки на проходящем рассеянном свете. По наличию просвечивающих зон вокруг колоний на непрозрачном мутном серо-белом фоне всего слоя агара делают вывод — культура стафилококка продуцирует ДНК-азу (рис. 52).

Сущность пробы заключается в том, что высокополимерная ДНК под воздействием соляной кислоты выпадает в

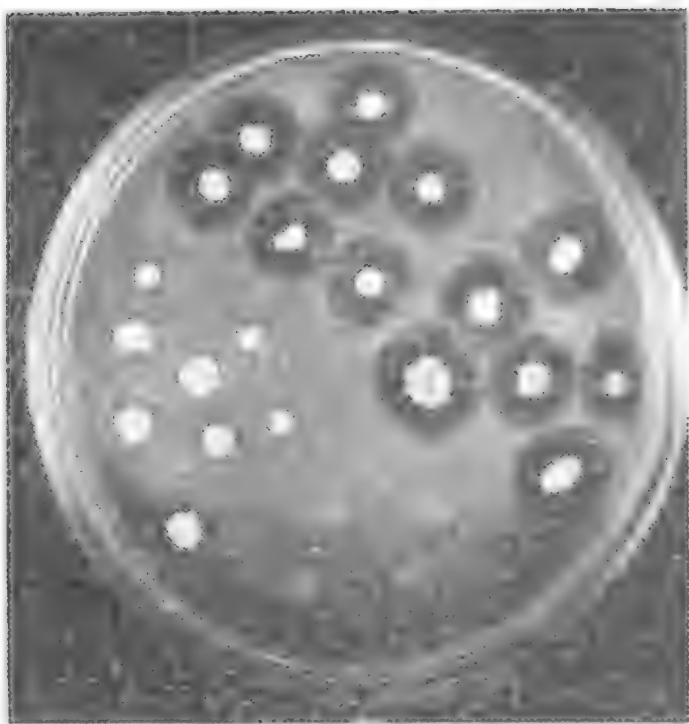


Рис. 52. ДНК-азная активность стафилококка.

нежный серо-белый осадок (преципитат). Если микроб выделяет фермент ДНК-азу, то в зоне его действия ДНК деполимеризуется и под влиянием соляной кислоты преципитат не образуется, агар в этой зоне остается прозрачным. Патогенные штаммы стафилококка обладают ДНК-азной активностью, вокруг колоний имеется зона просветления — деполимеризация ДНК.

К факторам вирулентности стафилококков относится так-

же фермент гиалуронидаза (фактор распространения).

Антигенная структура и фаготипы. У патогенных стафилококков различают общий видовой протеиновый антиген и три полисахаридных антигена (А, В, С). Среди последних известно 15 типоспецифических антигенов (а, b, c, d и т. д.).

В эпизоотологическом и эпидемиологическом отношении важным является фаготипирование стафилококков. Установлено, что одни фаготипы поражают человека, другие преимущественно обнаруживают у животных. Однако есть фаготипы (например, 42-Д), общие для животных и человека. Для типирования стафилококков используют специальный международный набор из 22 типов фагов. Этот набор можно применять для типирования стафилококков, выделенных только из пищевых продуктов (молоко, творог). Для типирования стафилококков, выделенных из других источников животного происхождения, необходимы другие типы фагов.

Вопросы для самопроверки. 1. Морфология и тинкториальные свойства стафилококков. 2. Культуральные и биохимические свойства стафилококков. 3. Патологический материал для бактериологического исследования при стафилококковых инфекциях. 4. Критерии патогенности стафилококков и методы их обнаружения. 5. Практическое значение фаготипирования стафилококков.

СТРЕПТОКОККИ

Стрептококки — *Streptococcus* — впервые были обнаружены при раневых инфекциях Бильротом (1874), затем Пастером при сепсисе (1880) и при гнойных процессах Ог-

стоном (1881). В чистой культуре из гноя стрептококк выделен Розенбахом (1884). В разные годы были предложены и различные классификации стрептококков. В настоящее время стрептококки относятся к порядку Eubacteriales, семейству Lactobacillaceae. По классификации Берджи стрептококки подразделяют на три группы: 1) гноеродные гемолитические *Str. pyogenes* (возбудители различных гнойно-воспалительных процессов — абсцессов, флегмон, сепсиса), *Str. agalactiae* — возбудитель мастита коров, *Str. equi* — возбудитель мыта лошадей; 2) зеленыя стрептококки — *Str. viridans* (термофильные, фекальные и др.), 3) молочнокислые стрептококки — *Str. lactis*, *Str. cremoris*.

В основу современной классификации положен принцип антигенной структуры микроба. По группоспецифическим полисахаридным антигенам Лансфилд разделила стрептококки на 17 групп, из которых более детально изучены группы А, В, С и D, как имеющие большее практическое значение.

Возбудитель мастита коров. У коров мастит вызывают микробы более 80 видов, но основными, наиболее частыми возбудителями являются маститный стрептококк — *Str. agalactiae* (*Str. mastitidis*) и патогенные стафилококки. В практике часто регистрируются маститы смешанной этиологии (стрепто-стафилококковые или в сочетании с синегнойной палочкой, кишечной палочкой и другими микробами).

Микробиологическими исследованиями при мастите выявляют этиологию болезни и свойства возбудителя. Диагноз субклинического мастита ставят на основании результатов комплексного исследования: 1) клинического осмотра всех животных; 2) физико-химических анализов паренхимного молока (бромтимоловая проба, проба Уайтсайда, пробы с димастином или мастидином); 3) иммунологических показателей паренхимного молока — повышенного фагоцитарного числа, положительной кольцевой реакции агглютинации с молоком и стрептококковым антигеном, окрашенным гематоксилином, повышенного количества лейкоцитов (проба отстаивания, разные методы подсчета); 4) бактериологического исследования.

Материал для бактериологического анализа. При клинически выраженном мастите в лабораторию направляют патологически измененный секрет вымени из каждого соска в отдельной стерильной пробирке. При подозрении на субклинический мастит первые порции

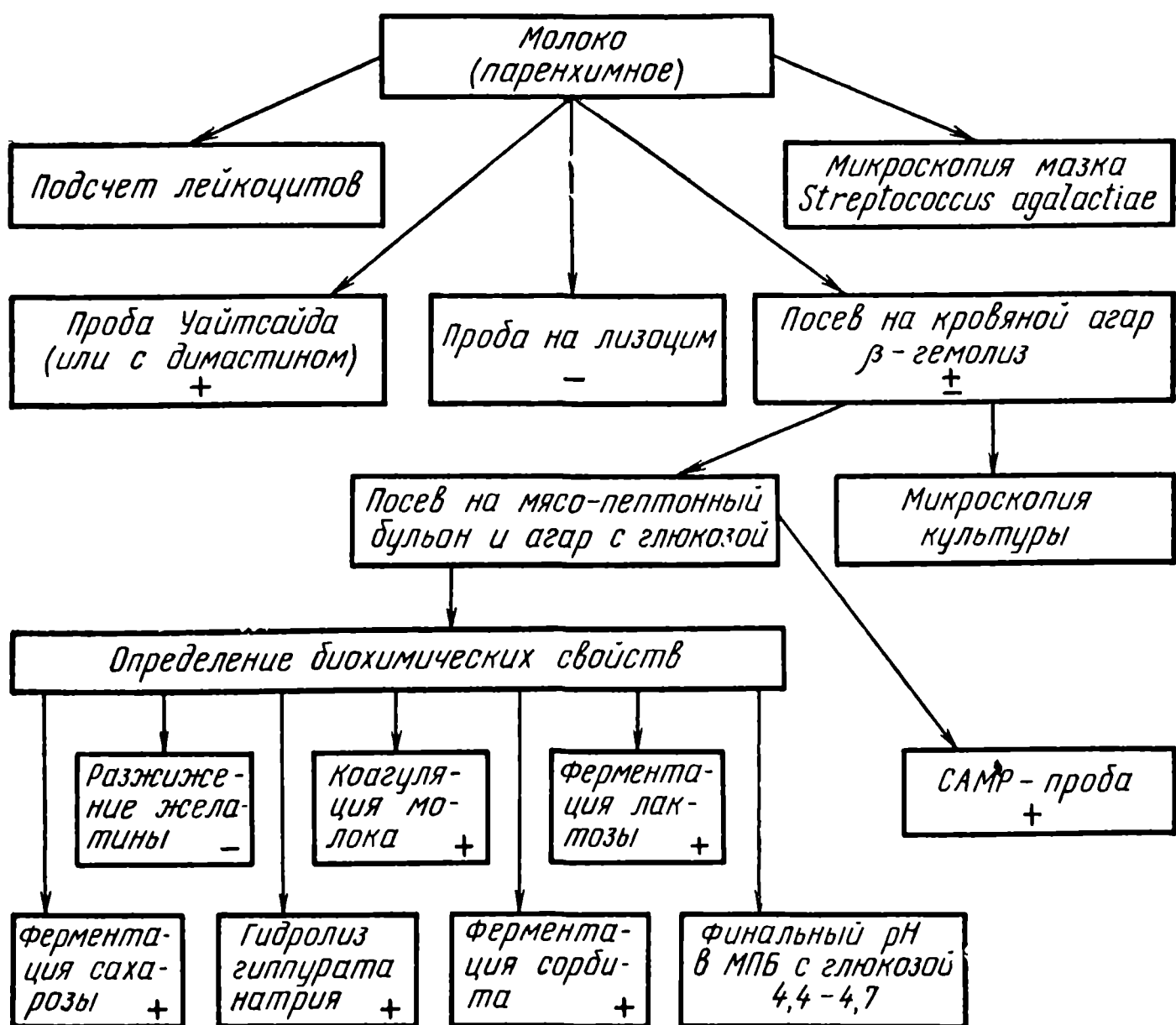


Рис. 53. Схема исследования молока для диагностики мастита.

молока сдаивают (их не используют), соски обрабатывают 70%-ным спиртом, а затем в стерильные пробирки отдельно из каждого соска выдаивают несколько струек паренхимного молока и закрывают пробкой. Бактериологическое исследование проводят не позднее двух часов после взятия пробы.

Схема бактериологического исследования включает микроскопию мазков из присланного материала, выделение чистой культуры и ее идентификацию (рис. 53). *Str. agalactiae* — мелкие, чуть сплюснутые или овальные кокки, располагающиеся в мазках из проб молока и воспалительного экссудата или жидкой питательной среды длинными цепочками (по несколько десятков клеток). В мазках из культур, выросших на плотных питательных средах, микроб образует короткие цепочки. Спор и капсул не образует (рис. 54). Хорошо окрашивается всеми анилиновыми красками, грамположительный.

Для микроскопирования из исследуемого материала готовят тонкие препараты-мазки (подобно мазкам для гематологического исследования), высушивают их, фикси-

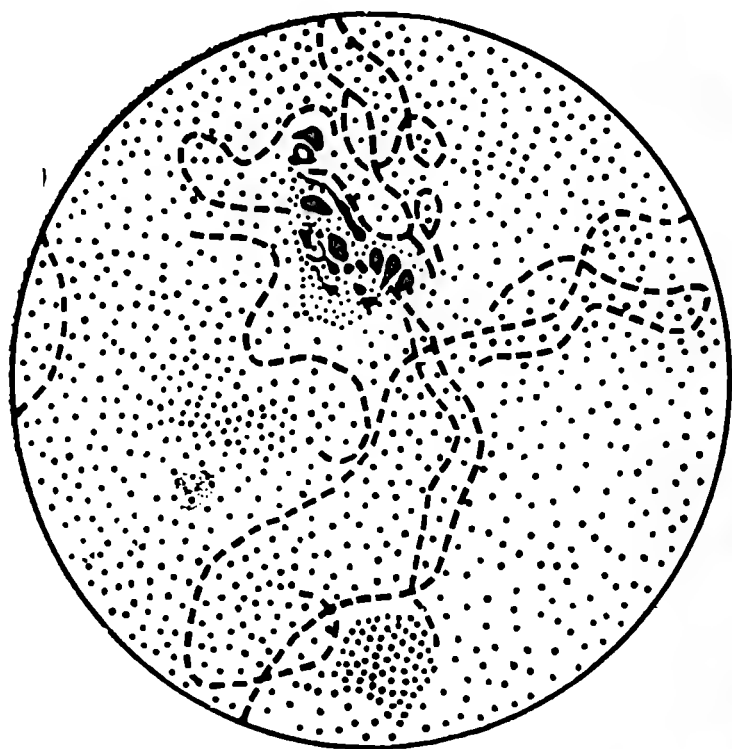


Рис. 54. Агалактийный стрептококк.

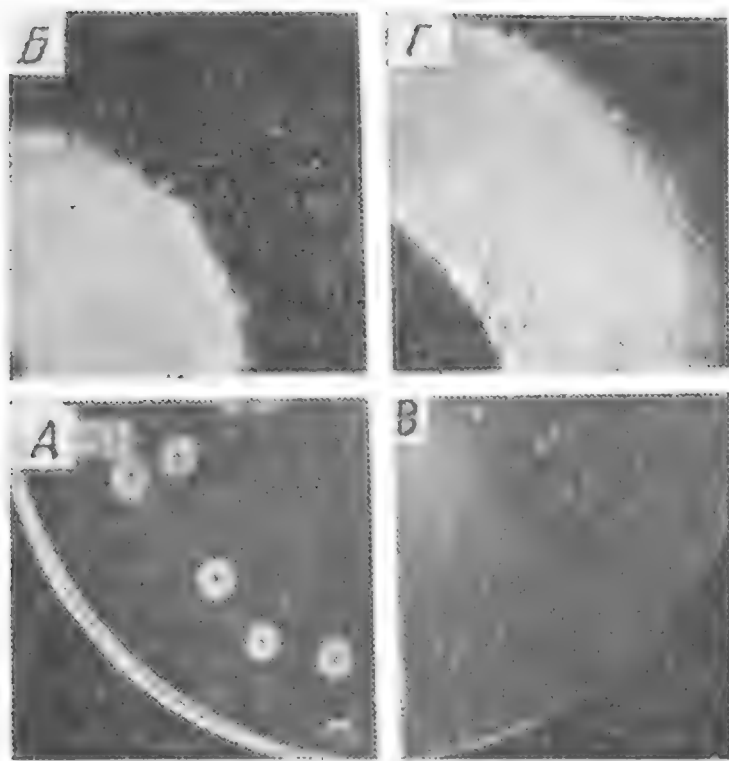


Рис. 55. Колонии гемолитического стрептококка на кровяном агаре: А и Г — прозрачная зона вокруг колоний (гемолиз β -типа), Б — увеличенная зона гемолиза, В — мелкие зоны гемолиза.

руют (лучше метиловым спиртом) и окрашивают азур-эозином (краска Гимза) по методу Романовского или метиленовой синькой Леффлера. Эти методы окраски дают возможность не только обнаружить стрептококки, но и выявить клеточные элементы в препарате, определить фагоцитарное число. Обнаружение в мазках стрептококков и повышенного количества лейкоцитов указывает на воспаление молочной железы.

Культурально-биохимические свойства. Маститный стрептококк аэроб. На обычных питательных средах растет слабо. Хорошо культивируется на средах с добавлением дефибринированной крови или кровяной сыворотки. В сывороточном МПБ растет в виде мелкозернистого осадка, при этом среда остается прозрачной. На кровяном МПА образует мелкие (точечные) блестящие сероватые колонии, окруженные зоной гемолиза (гемолиз β -типа) (рис. 55).

Чистую культуру стрептококка получают путем пластинчатого посева секрета на кровяной МПА в чашках Петри, суточного инкубирования при 37° и последующей отливки (пересева) типичной для данного микроба колонии на сывороточный МПБ и кровяной агар. Полученную культуру идентифицируют с учетом морфологических, культуральных, биохимических, гемолитических свойств и по антигенной структуре, которую выясняют в реакции диф-

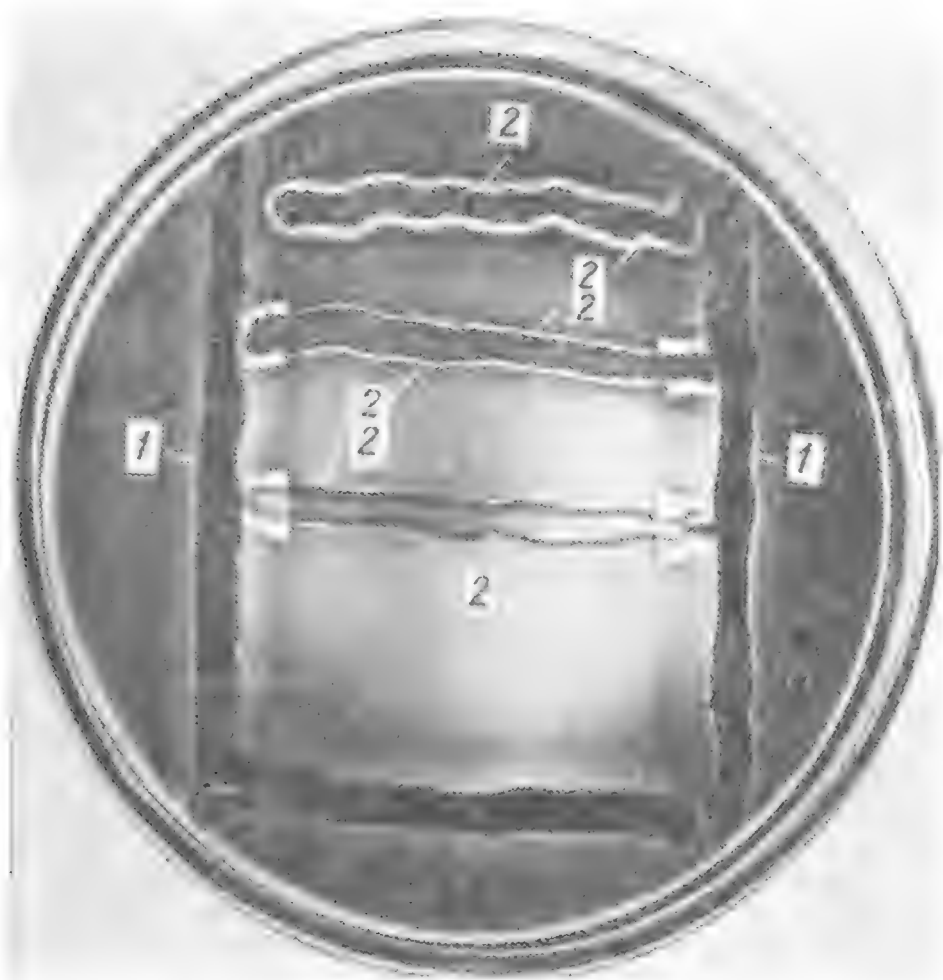


Рис. 56. Гемолитическая активность стрептококков (2) и стафилококков (1) по САМР-методу (КАМП-методу).

фузионной преципитации в агаровом геле или методом флюоресцирующих антител со специфическими сыворотками. Агалактийный стрептококк не разжижает МПЖ и свернутую сыворотку, не обесцвечивает метиленовое молоко; лакмусовое молоко изменяет частично. Ферментирует с образованием кислоты глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, салицин. Не ферментирует сорбит и дульцит. Штаммы, обладающие скрытой гемолитической способностью, видимой зоны гемолиза не образуют. Для выявления их потенциальной гемолитической активности используют САМР (КАМП)-метод, получивший свое название по первоначальным буквам фамилий австралийских исследователей — Кристи, Аткинс и Мунх — Петерсон. Метод заключается в том, что на пластинчатый кровяной агар в чашке Петри по диаметру петлей высевают в виде прямой полоски бета-гемолитический стафилококк. Отступив от нее 2—3 мм и перпендикулярно к ней, высевают исследуемые штаммы стрептококков (по 3—4). Сутки их выдерживают при 37°. Агалактийный стрептококк проявляет гемолиз в зоне, близкой к полоске выросшего стафилококка (рис. 56). По антигенной структуре *Str. agalactiae* относят к серогруппе В (рис. 57).

Группа стрептококков	Виды стрептококков	Серологическая группа	Тип гемолиза	Финальный рН в бульоне с глюкозой	Р о с т					Гидролиз глицерата натрия	Восстановление 0,1% р-А метиленовой синьки	Свертывание молока	Ферментация				Перезживание после 30 мин. прогрева при 60°
					МПБ с 40° жел-чи	при 10°	при 45°	при рН-9,6	в среде с 6,5% NaCl				Сор-бита	Лак-тозы	Сали-цина	Ман-нита	
Гноерод-ные	<i>Strept. pyogenes humanus</i>	A	β	4,8-5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	<i>Strept. agalactiae</i>	B	β ±	4,2-4,8	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
	<i>Strept. dysagalactiae</i>	C	α	5,0-5,3	-	-	-	-	-	-	+	+	-				-
	<i>Strept. pyogenes animalis</i>	C	β	4,5-5,4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	<i>Strept. equi</i>	C	β	4,5-5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Зеленящие	<i>Strept. salivaris</i>		α		-	-	+	-	-		-	+	-	+			-
	<i>Strept. equinus</i>		α		-	-	+	-	-		-	-	+				+
	<i>Strept. bovis</i>		α		-	-	+	-	-		-	+	-				+
	<i>Strept. thermophylus</i>		α		-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Молочно-кислые	<i>Strept. lactis</i>	N	γ	4,2-4,5	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Strept. cremoris</i>	N	γ	4,2-4,5	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Энтеро-кокки	<i>Strept. faecalis</i> :									-							
	α. <i>Strept. liquefaciens</i>	D	α		+	+	+	+	+	-	+	+	+				+
	δ. <i>Strept. zymogenes</i>	D	β							-							+
	<i>Strept. durans</i>	D	β							-							+
	<i>Strept. abortus equi</i>	D	α			+	+	+	+	-	+	+	+				+

Рис. 57. Схема дифференциации стрептококков по биохимическим, биологическим и серологическим свойствам.

П а т о г е н н ы е с в о й с т в а по отношению к лабораторным животным проявляются при внутрибрюшном заражении белых мышей и морских свинок.

Вопросы для самопроверки. 1. Правила взятия проб для исследования на мастит. 2. Питательные среды и культивирование возбудителя мастита. 3. Культурально-морфологические и биохимические особенности возбудителя мастита; методы дифференциации агалактийного стрептококка. 4. Принцип применения САМР-метода.

Возбудитель мыта — *Streptococcus equi* (открыт Шютцем в 1888 г.). Мыт — контагиозное заболевание главным образом молодых лошадей (до двух лет), характеризуется катарально-гнойным воспалением слизистой оболочки верхних дыхательных путей, глотки, подчелюстных лимфоузлов.

Для бактериологического диагноза в лабораторию направляют гной, воспалительный экссудат, истечения из носа. Исследование проводят по общей схеме: 1) микроскопия препаратов-мазков из поступившего материала; 2) посев на питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя и ее идентификации; 3) биологическая проба на белых мышах и котятах (рис. 58).

Мазки готовят тонким слоем, фиксируют, окрашивают по Граму и Романовскому — Гимза. Для *Str. equi* характерно расположение длинными цепочками сплюснутых кокков. Величина клеток 0,4—1 мкм. Окрашивается грам-положительно. Неподвижен.

Для выделения чистой культуры производят пластинчатый посев на сывороточно-глюкозный агар (на обычных средах не растет). Через 24 ч на агаре мытный стрептококк образует мелкие, просвечивающиеся, похожие на капельки росы, колонии. Характерно слияние колоний между собой. На свернутой кровяной сыворотке *Str. equi* растет стекловидными сероватыми колониями. На кровяном агаре рост в виде мелких колоний с зоной β-гемолиза. В среде Китт — Тароцци, сывороточном бульоне рост проявляется мелкими крупинками, выстилающими дно и стенки пробирки, бульон остается прозрачным. В мазках из бульонной и агаровой культур цепочки стрептококка короткие, по несколько клеток или даже по два кокка.

Б и о х и м и ч е с к и е с в о й с т в а *Str. equi* слабо выражены. Молоко простое не свертывает, лакмусовое и метиленовое молоко не обесцвечивает (не редуцирует), не сбраживает лактозу, сорбит и маннит. Отсутствие фермен-

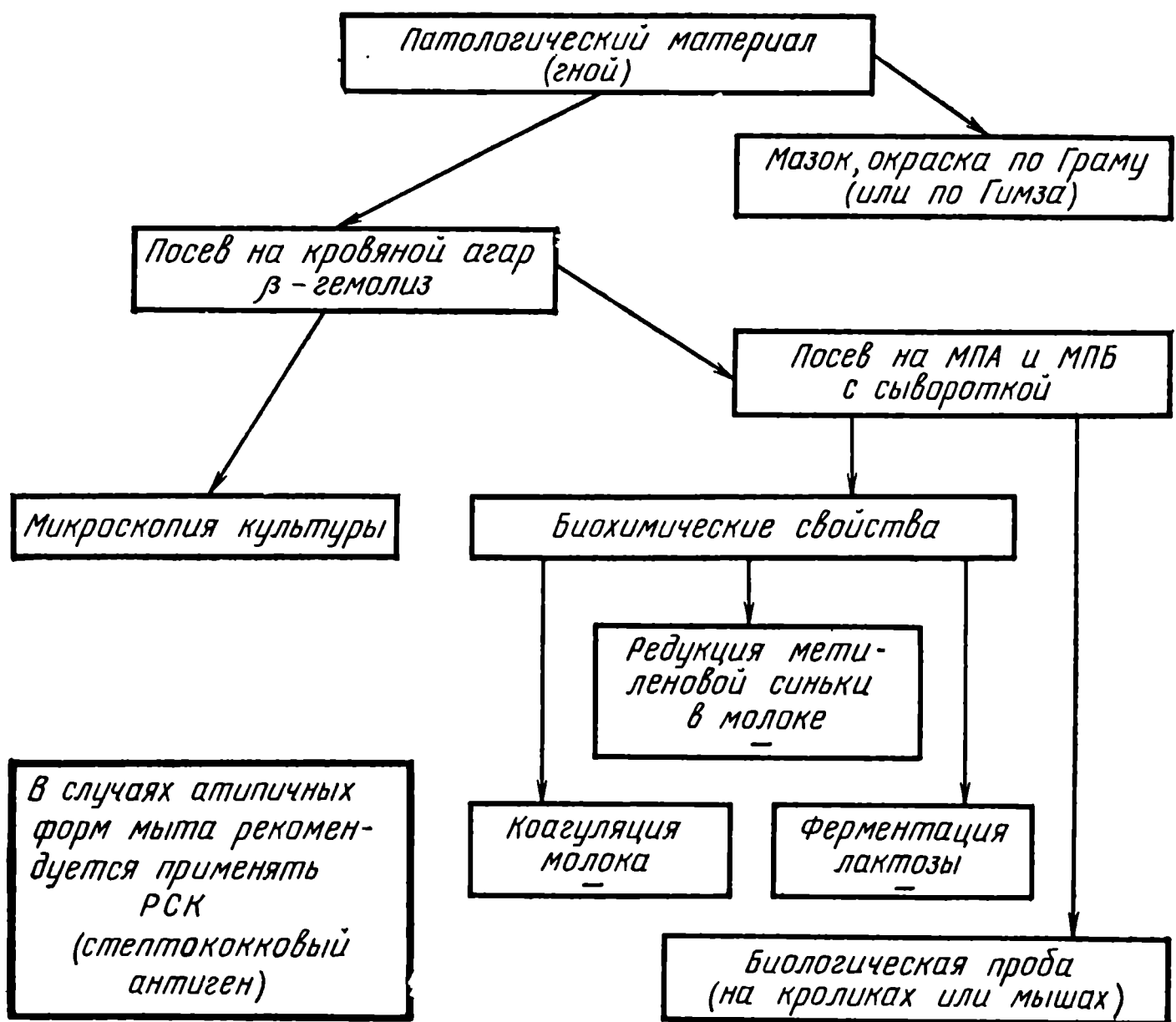


Рис. 58. Схема исследования патологического материала для диагностики мьта.

тации названных углеводов позволяет дифференцировать мьтный стрептококк от гноеродного гемолитического стрептококка (*Str. pyogenes*), который сбразивает лактозу, свертывает молоко, редуцирует метиленовую синьку.

Для б и о п р о б ы пригодны кошки, особенно котята, которые гибнут от ничтожно малой дозы бульонной культуры при подкожном заражении в течение 3—10 дней после подкожного или внутрибрюшинного заражения. Выделенную чистую культуру можно идентифицировать при помощи мьтного антивируса, который представляет собой фильтрат 20-суточной бульонной культуры *Str. equi*. В данном фильтрате мьтный стрептококк не растет, а другие виды стрептококков, например *Str. pyogenes*, растут.

При атипичной форме мьта можно применять РСК с мьтным антигеном.

Вопросы для самопроверки. 1. Культурально-биохимические свойства мьтного стрептококка. 2. Бактериологическая диагностика мьта. 3. Дифференциация мьтного стрептококка от *Str. pyogenes* и *Str. agalactiae*. 4. Мьтный антивирус и его использование для идентификации возбудителя мьта,

Семейство Enterobacteriaceae включает несколько родов бактерий, имеющих сходство по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам и отличающихся по биохимическим признакам. Наиболее важное значение для ветеринарной практики имеют бактерии родов *Escherichia* и *Salmonella*, вызывающие у животных и человека заболевания колибактериоз и сальмонеллез.

Возбудитель колибактериоза — кишечная палочка *Escherichia coli*, впервые была выделена Эшерихом (1886) и описана под названием *Bact. coli commune*. Этиологическая роль кишечной палочки при массовых желудочно-кишечных заболеваниях молодняка животных, в частности у новорожденных телят, установлена Йенсеном (1891—1892).

Колибактериоз — остропротекающее инфекционное заболевание молодняка разных видов животных (включая птиц и пушных зверей). Заболевание характеризуется, как правило, диареей (профузным поносом), обезвоживанием, депрессией, нарастающей слабостью и смертельным исходом. Колибактериоз протекает в трех формах: септической, энтеротоксемической и энтеритной. Последние две формы без сепсиса. Восприимчивы телята в первые часы и дни после рождения; поросята заболевают как в период новорожденности, так и после отъема. Кроме того, у поросят кишечная палочка вызывает отечную болезнь. Ягнята заболевают с первых дней после рождения до 5—6-месячного возраста. Птица поражается в основном в первые 2—3 мес. Взрослые животные колибактериозом не болеют, но являются бактерионосителями патогенных *E. coli*. Кишечная палочка может быть также возбудителем мастита и эндометрита. Для бактериологического исследования в лабораторию направляют патологический материал:

Для прижизненной диагностики

Фекалии от больных животных берут из прямой кишки в стерильные пробирки стеклянной палочкой, опаянной на конце, или резиновым катетером

Для посмертной диагностики

Свежий труп или трубчатую кость, долю печени с желчным пузырем, селезенку, почку, брыжеечные лимфоузлы, отрезок тонкого отдела кишечника, перевязанного с двух концов лигатурой (упаковка отдельно от остального материала)

При вскрытии трупа в лаборатории помимо указанного материала исследуют также кровь из сердца и головной мозг. Если в лабораторию не представляется возможным в кратчайший срок доставить материал, его консервируют: фекалии — раствором стерильного глицерина с NaCl (глицерина — 250,0, поваренной соли — 5,0, дистиллированной воды — 750,0). Кусочки внутренних органов — 30%-ным водным раствором глицерина или 10%-ным раствором NaCl. Материал, доставленный в лабораторию, исследуют по схеме (рис. 59). При бактериологическом исследовании учитывают следующие особенности возбудителя.

Микроскопия. *E. coli* — палочки с закругленными краями, грамтрицательные, споры не образуют, длина 1—3 мкм, ширина 0,8 мкм. В мазках расположение одиночное, подвижные (перитрихи) или неподвижные бактерии. Капсулу не образуют, за исключением отдельных штаммов серогрупп (08, 09, 0101).

Выделение чистой культуры и определение культурально-биохимических свойств. Посев производят на среды Эндо (или Левина), МПБ и МПА. По типу дыхания аэроб, растет на всех обычных широко используемых питательных средах, оптимальная температура 37—38°, рН среды 7,0—7,2. На МПА через 18—20 ч вырастают влажные, круглые колонии с ровными краями и гладкой поверхностью. В жидкой среде рост кишечной палочки проявляется равномерным помутнением среды с образованием осадка. Некоторые штаммы *E. coli* обладают гемолитическими свойствами.

Для дифференциации *E. coli* от других представителей семейства *Enterobacteriaceae* определяют ее биохимические свойства (рис. 60). На среде Эндо *E. coli* образует красные колонии (розово-малиново-красные), на среде Левина — колонии темно-фиолетовые. Глюкозу и лактозу сбраживает с образованием кислоты и газа (встречаются лактозонегативные варианты, которые не сбраживают лактозу), обесцвечивает метиленовую синьку в молоке, молоко свертывает, сбраживает также маннит, дульцит, арабинозу, образует индол. Реакция с метилротом положительная, проба Фогес — Проскауэра отрицательная.

Эти реакции ставят с двухсуточными культурами на специальной среде Кларка следующего состава: пептона — 5,0, глюкозы — 5,0, K_2HPO_4 — 5,0, дистиллированной воды 1000 мл. Среду стерилизуют текучим паром или автоклавируют при 0,5 атм 15 мин. В одну пробирку с культу-

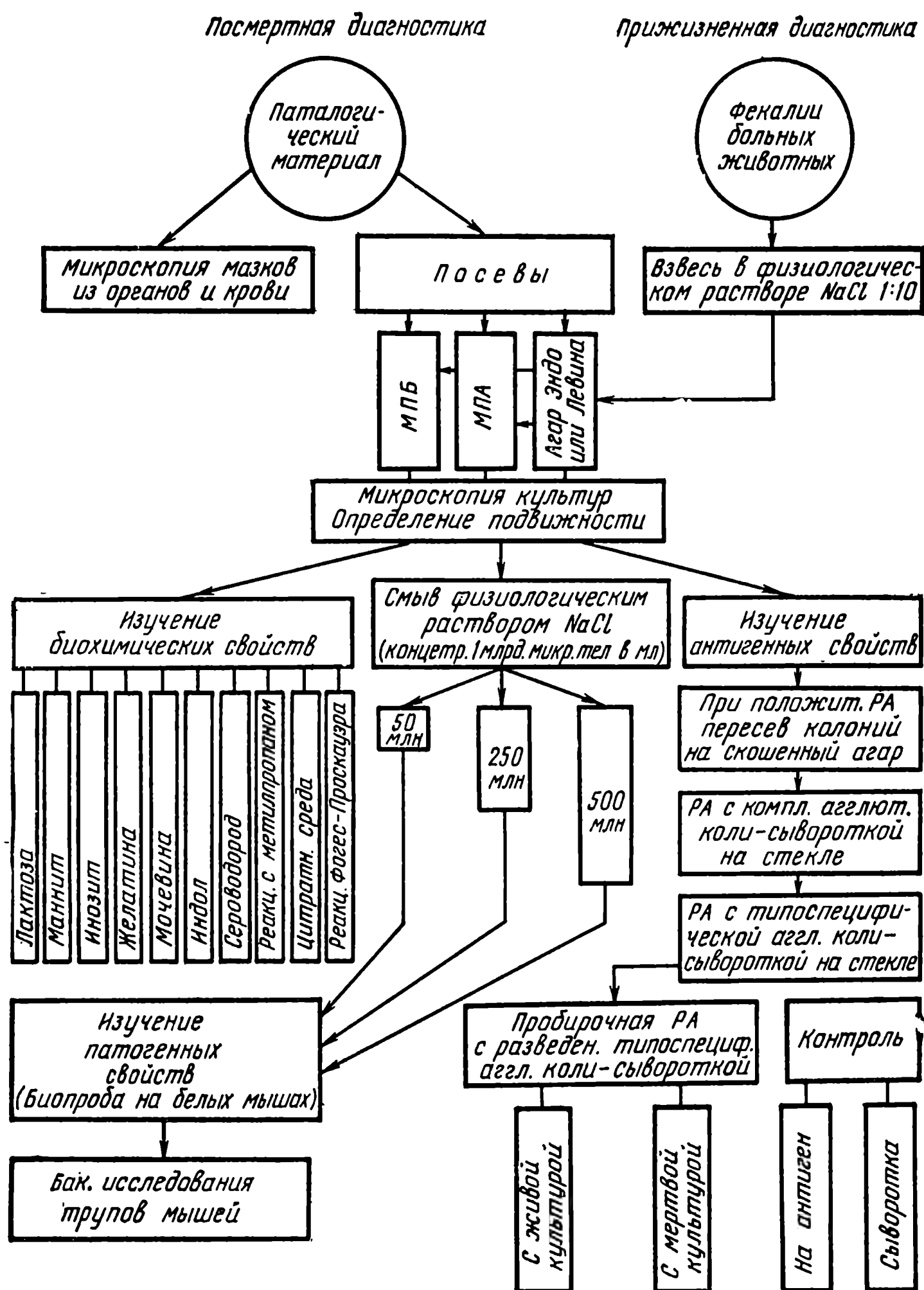


Рис. 59. Схема бактериологического исследования материала на коли-бактериоз.

Морфологические и биохимические признаки	Род <i>Escherichia</i>			Род <i>Cloaca</i> (<i>B. cloacae</i>)	Род <i>Klebsiella</i>	Род <i>Proteus</i>				Род <i>Salmonella</i> (<i>B. paratyphi</i>)
	<i>E. coli</i>	<i>B. paracoli</i>	<i>E. freundii</i>			<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. morganii</i>	<i>P. rettgeri</i>	
Подвижность	<u>+</u> или	<u>+</u> или	<u>+</u> или	<u>+</u> РЕЖЕ	—	<u>+</u> РЕЖЕ	<u>+</u> РЕЖЕ	<u>+</u> РЕЖЕ	<u>+</u> РЕЖЕ	<u>+</u> РЕЖЕ
Капсула	—	—	—	—	<u>+</u> или	—	—	—	—	—
Лактоза	+	—	+	<u>+</u> РЕЖЕ	+	—	—	—	—	—
Желатина	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—
Индол	+	<u>+</u> или	<u>+</u> или	—	—	+	—	+	+	—
Сероводород	—	—	+	—	—	+	+	СЛАБО +	—	<u>+</u> РЕЖЕ
Реакция с метилротом	+	+	+	—	—	+	+	+	<u>+</u> или	+
Реакция Фогес- Проскауэра	—	—	—	+	+	<u>—</u> РЕЖЕ +	<u>—</u> РЕЖЕ +	—	<u>+</u> или	—
Усвоение цитратн. солей	—	<u>—</u> РЕЖЕ +	+	+	+	<u>—</u> РЕЖЕ +	<u>—</u> РЕЖЕ +	—	+	<u>+</u> РЕЖЕ
Разложение мочевины	—	—	<u>—</u> РЕЖЕ +	<u>+</u> или	<u>+</u> РЕЖЕ	+	+	+	+	—
Свертывание молока	+	—	+	<u>+</u> РЕЖЕ	+	—	—	—	—	—
Изменение цвета лакмус. молока	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Рис. 60. Основные дифференцирующие признаки бактерий сем. Enterobacteriaceae.

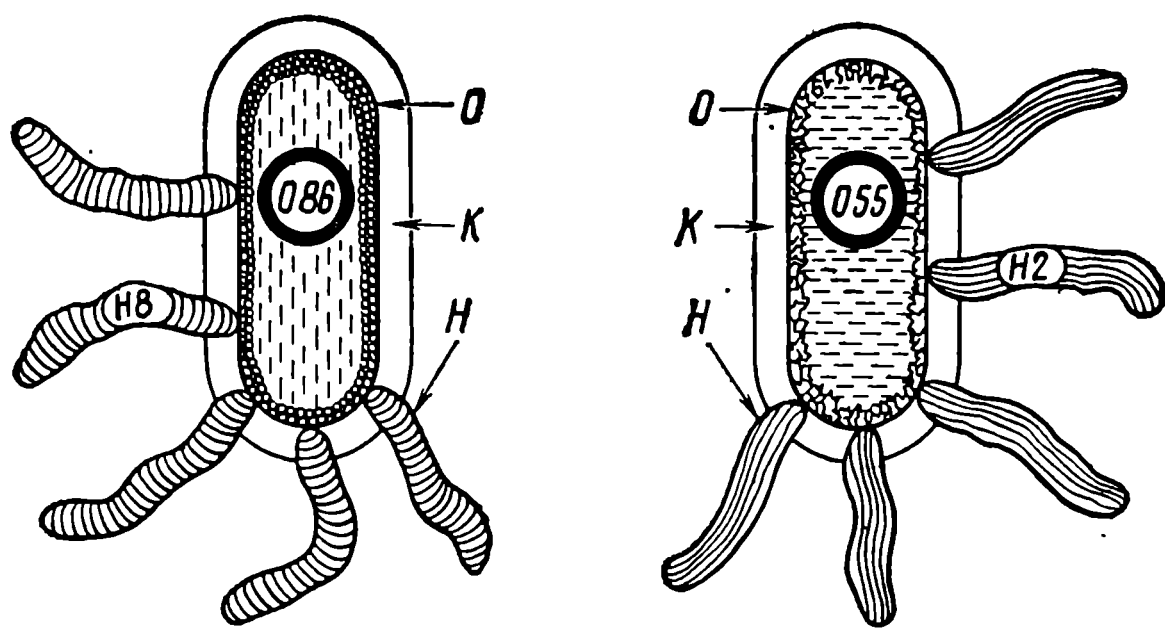
рой в данной среде пипеткой добавляют 5 капель индикатора метилрота (метилрот — 0,01, 96°-ный спирт-ректификат — 30 мл, дистиллированная вода — 20 мл), после чего пробирки встряхивают. Розово-красное окрашивание учитывают как положительный результат, желтое окрашивание — как отрицательный, что связано с изменением рН культуры вследствие ферментации глюкозы. В другую пробирку с культурой на среде Кларка добавляют 0,2 мл 40%-ного раствора КОН и 0,5 мл 6%-ного спиртового раствора альфа-нафтола. Учет производят через 3—5 мин. При

положительном результате появляется розовое окрашивание вследствие реакции индикатора и образовавшегося в среде ацетилметилкарбинола при расщеплении глюкозы. При отрицательном результате — желтое окрашивание.

На средах Козера (жидкая) и Симмонса (агаровая с индикатором бромтимолблау) *E. coli* не растет, так как не усваивает цитратно-аммонийные соли. Среда Козера синтетическая бесцветная, состоит из: кислого фосфорнокислого натрий-аммония ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) — 1,5, однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) — 1,0, сернокислого магния ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) — 0,2, лимоннокислого натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 3,0, дистиллированной воды — 1000 мл. Раствор этой смеси пропускают через бумажный фильтр, разливают по пробиркам, стерилизуют при 120° 15—20 мин. Помутнение среды после двухсуточного культивирования в термостате указывает на рост бактерий; при отсутствии роста бактерий среда остается без изменений. На среде Симмонса цитратно-аммонийно-положительные бактерии растут с изменением цвета среды в ярко-синий. Микроорганизмы, не усваивающие цитратные и аммонийные соли, на среде Симмонса не растут и цвет ее не изменяется.

Основываясь на морфологических и культурально-биохимических свойствах, проводят межродовую дифференциацию. Но биологические свойства бактерий разных штаммов одного и того же вида могут быть неодинаковыми, что объясняется их различной вирулентностью и антигенной структурой, установление которых входит в комплекс микробиологических диагностических исследований. Выделенную чистую культуру типируют в РА, используя типоспецифические агглютинирующие коли-сыворотки.

Антигенное строение. Клетка кишечной палочки содержит три типа антигенов — О (соматический), К (оболочечный, капсульный) и Н (жгутиковый). *О-антиген* термостабильный, расположен в клеточной стенке, состоит из липидо-полисахарида-протеинового комплекса: липид определяет токсичность (эндотоксин), полисахарид — серологическую специфичность, протеин — носитель антигенного свойства. *К-антигены* — поверхностные, оболочечные. Это кислые полисахариды, редко протеины. По своим свойствам их подразделяют на три типа: В, L, А. Тип В — термолабильный, инактивируется при 100° в течение 1 ч. Тип L — термолабильный, инактивируется при 60° в течение 1 ч. Тип А — термостабильный, имеется у слизистых кап-



Типы К-антигена

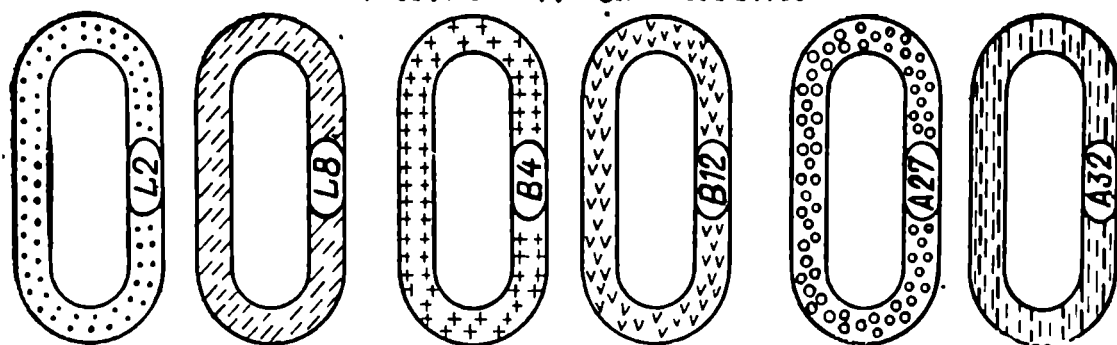


Рис. 61. Схема антигенного строения *Escherichia coli*:

О-антиген соматический термостабильный; К-антиген поверхностный; Н-антиген жгутиковый термолабильный; L- и В — L- и В-антигены оболочечные термолабильные; А — капсульные термостабильные антигены.

сулообразующих штаммов, разрушается при 120° в течение 2,5 ч. *Н-антиген* — белковой природы, термолабильный, представлен несколькими десятками серологических разновидностей.

Антигенное строение принято выражать формулой — за буквенным обозначением каждого антигена идут арабские цифры, отделяют их двоеточием, например, 0111 : В4 : Н2 или 055 : В5 : Н10. Цифры обозначают порядковый номер антигена в диагностической антигенной схеме, созданной Кауффманом с сотр. (рис. 61). Антигеном каждого типа гипериммунизируют кролика и получают специфические агглютинирующие сыворотки для диагностических целей. Биологическая промышленность выпускает сыворотки к О-антигенам, поэтому в лабораториях проводят серологическую типизацию серогрупп кишечной палочки. Наиболее частыми возбудителями колибактериоза являются бактерии серогрупп 078, 086, 015, 08, 09, 0119, 0137, 0115, 041, 0141, 0149 и др.

П а т о г е н н о с т ь *E. coli* в лабораторных условиях определяют внутрибрюшинным заражением белых мышей.

В большинстве случаев *E. coli*, выделенные из трупа или фекалий больных коли-инфекцией животных, патогенны для мышей. Культуры *E. coli*, выделенные от здоровых животных (и людей), обычно непатогенны. Патогенность для белых мышей зависит от вирулентности штамма, дозы вводимых бактерий, веса (возраста) мышей, метода заражения и индивидуальной иммунологической реактивности, условий их содержания и кормления. Белые крысы мало чувствительны к *E. coli*, щенки, котята в возрасте 2—3 мес. восприимчивы при оральном заражении. Для биопробы можно использовать куриные эмбрионы, гибель которых наступает через 24—48 ч после заражения единичными бактериями *E. coli*.

Одним из важных факторов вирулентности кишечной палочки является ее способность продуцировать токсины двух типов: термолабильный экзотоксин и термостабильный эндотоксин (полисахаридо-липидо-протеиновый комплекс). Имеются штаммы *E. coli*, которые продуцируют антибиотические вещества — колицины, подавляющие рост некоторых других штаммов кишечной палочки и не действующие на бактерий других видов. Колицины термостабильны. Могут продуцироваться как патогенными, так и непатогенными штаммами.

Помимо общепринятого микробиологического исследования, существуют также некоторые дополнительные методы диагностики.

Люминесцентно-серологический метод используют как ориентировочный для определения патогенных серотипов *E. coli* при массовых вспышках желудочно-кишечных заболеваний. Этот метод позволяет за короткий срок получить предварительные результаты.

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации и реакция нейтрализации — ускоренные методы, позволяющие обнаружить в фекалиях больных животных возбудителя и установить его концентрацию.

Фагодиагностика пока еще не нашла практического применения из-за того, что существует большое количество фаготипов *E. coli*, которых нельзя дифференцировать по культурально-биохимическим и антигенным свойствам, а также потому, что многие фаги лизируют патогенные и непатогенные штаммы кишечной палочки разных серологических групп.

Вопросы для самопроверки. 1. Патологический материал для прижизненной и посмертной диагностики колибактериоза. Методы его консервирования. 2. Морфология, тинкториальные свойства *E. coli*. 3. Культурально-биохимические свойства кишечной палочки. 4. Дифференциально-диагностические питательные среды, широко применяемые при диагностике колибактериоза, особенности роста *E. coli* на этих средах, 5. Антигенная структура *E. coli*. Серологическая типизация.

В о з б у д и т е л и с а л ь м о н е л л е з о в. У животных заболевания вызывают главным образом следующие виды рода сальмонелл: *Salmonella enteritidis*, *Salm. cholerae suis* (*Suipestifer*), *Salm. typhimurium*, *Salm. pullorum*, *Salm. abortus equi*, *Salm. abortus ovis*. Бактерии данного рода впервые описал Салмон (1885), в честь которого они получили родовое название *Salmonella* (син. *Bact. paratyphi*). Сальмонеллы у молодняка разных видов животных протекают в острой септической форме. У телят — в возрасте от 3—4 недель до 4—5 мес. с явлениями лихорадки и профузного поноса; у поросят — до четырех месяцев, у овец — всех возрастов (возможно внутриутробное инфицирование); у жеребят, как правило, — внутриутробное инфицирование. У конематок заболевание характеризуется абортами. Аборты отмечают и у овцематок.

Для бактериологического диагноза направляют: от абортировавших овцематок и кобыл — абортированный плод или плодовые оболочки, околоплодную жидкость, истечения из родовых путей, желудок плода, органы плода. В остальных случаях (при септической форме) посылают труп целиком, либо трубчатую кость, долю печени с желчным пузырем, селезенку, почку, брыжеечные лимфоузлы. Для прижизненной диагностики исследуют фекалии больных (редко прибегают к получению гемокультуры). Порядок бактериологического исследования материала от разных видов животных (см. рис. 62). Все виды рода *Salmonella* обладают многими общими свойствами, поэтому предварительно при исследовании выделенной культуры проводят родовую дифференциацию, а затем — видовую (внутри рода).

М и к р о с к о п и я. Из тканей органов готовят препараты-отпечатки и окрашивают их по Граму. Сальмонеллы грамотрицательные палочки величиной 2—4 мкм. Споры и капсулу не образуют, располагаются одиночно, иногда попарно.

В ы д е л е н и е ч и с т о й к у л ь т у р ы из патологического материала осуществляют посевом на дифференциально-диагностические среды. Наиболее часто используют агар Эндо, среду Плоскирева или висмут-сульфит-агар (модифицированная среда Вильсон — Блера). Оптимальный рН среды 7,2—7,4. На средах Эндо и Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний; на висмут-сульфит-агаре — черных колоний. При посевах из органов трупа используют МПБ и МПА в пробирках. В МПБ рост

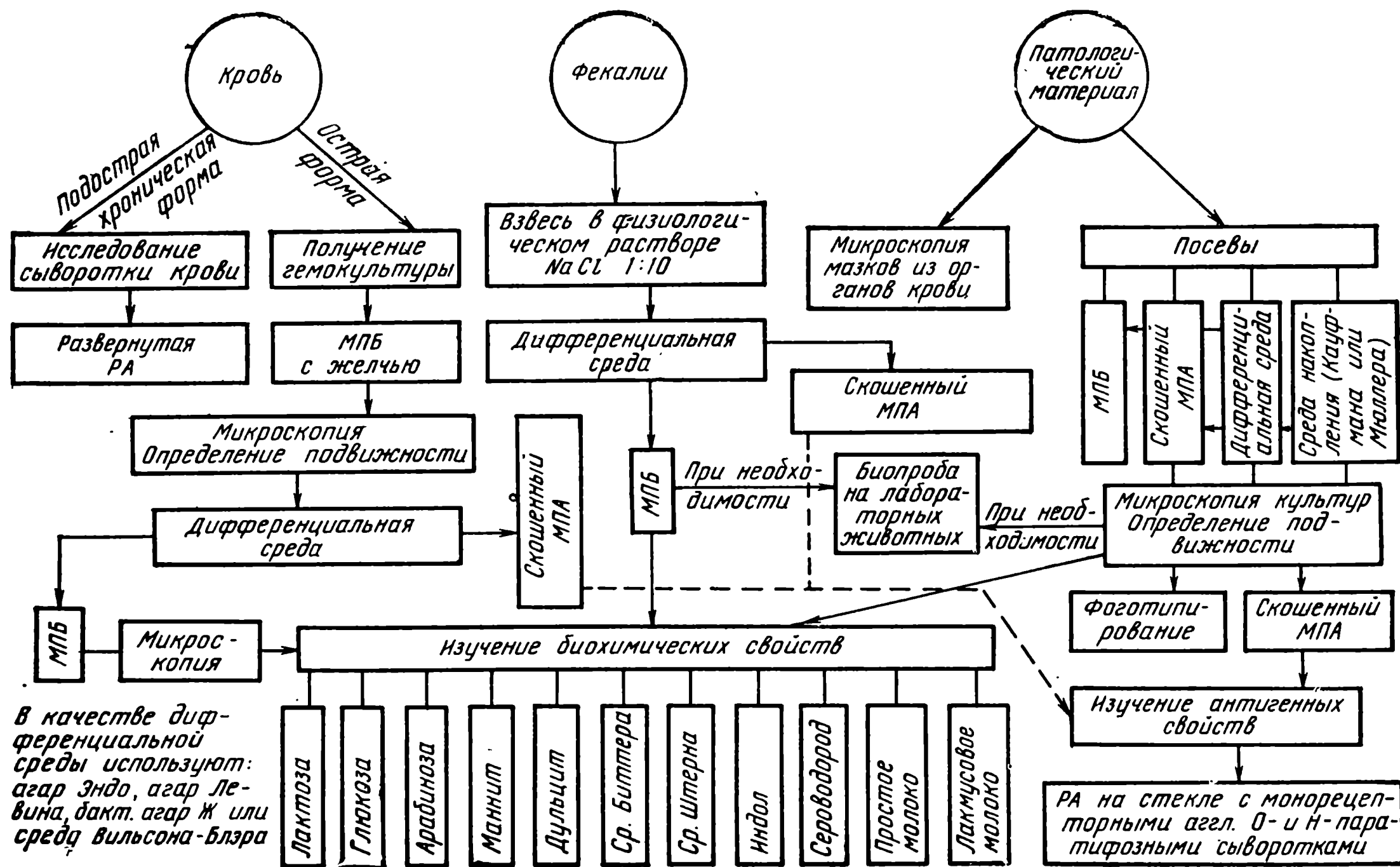


Рис. 62. Схема бактериологического исследования на сальмонеллез.

диффузный, на МПА сальмонеллы формируют гладкие бесцветные прозрачные колонии с ровными краями. Сальмонеллы ферментируют глюкозу, не сбраживают лактозу, сахарозу, не свертывают молоко, не редуцируют метиленовую синьку в молоке. Не образуют индола. Отдельные виды образуют сероводород. Реакция с метилротом положительная, Фогес — Проскауэра — отрицательная.

При дифференциации видов сальмонелл внутри рода используют среды Биттера и Штерна. В состав среды Биттера входят: рамноза — 5,0, двуосновной фосфорнокислый натрий — 0,5, сернокислый аммоний — 1,0, лимоннокислый натрий (трехосновной) — 2,0, NaCl — 0,5, пептон — 0,05 и дистиллированная вода — 1000 мл. Глицерин-фуксин-бульон Штерна состоит из: МПБ, 100 мл с насыщенным раствором основного фуксина — 5—6 капель, глицерина — 1 мл и 10%-ного водного раствора сульфита натрия — 2 мл. Эти среды стерилизуют текучим паром 10—15 мин. Положительный результат на средах Биттера и Штерна проявляется покраснением среды. Отрицательный результат — желтое окрашивание.

С е р о л о г и ч е с к у ю т и п и з а ц и ю выделенной культуры проводят с культурой, выросшей на скошенном агаре с конденсатом. Применяют пластинчатый метод РА. У сальмонелл различают соматический термостабильный О-антиген и жгутиковый термолабильный Н-антиген. Поскольку по О-антигену, общему для нескольких видов сальмонелл, последние подразделяются на группы (обозначенные заглавными буквами латинского алфавита), вначале исследуемую культуру проверяют с групповыми (поливалентными) сальмонеллезными агглютинирующими сыворотками в РА на стекле. При положительном результате с групповой сывороткой проводят испытание той же культуры с монорецепторными О-сыворотками тех рецепторов, которые входят в данную группу. Кроме того, эти культуры еще испытывают с монорецепторными Н-сыворотками. Если культура типична по биохимическим свойствам, но не агглютинирует с О- и Н-сыворотками, следует испытать ее отношение к сальмонеллезному бактериофагу, чувствительность к которому свидетельствует о принадлежности к роду сальмонелл.

Возбудитель сальмонеллеза (паратифа) телят — *Salm. enteritidis* — открыт Гертнером в 1888 г. Реже сальмонеллез телят может быть обусловлен *Salm. typhimurium*, по антигенной структуре входящего в группу В. Этот микроб

часто вызывает сальмонеллез у водоплавающей птицы, а варианты *Salm. enteritidis dublin*, *rostock* — заболевание у человека в виде гастроэнтерита вследствие пищевой токсикоинфекции. Вариант *Salm. danysz* патогенен для крыс и родственных грызунов, патогенен для человека, обнаружен у крупного рогатого скота, свиней и коз. По антигенному строению *Salm. enteritidis* (и варианты) относятся к группе D. В эту же группу входит и возбудитель пуллороза (тифа кур) *Salm. pullorum gallinarum*. Пуллороз протекает остро, септически, с большим процентом гибели, достигающим до 100%. В лабораторию направляют свежий труп. Взрослая птица болеет бессимптомно, хронически. Для выявления таких кур-бактерионосителей обследуют взрослую птицу в условиях хозяйства серологическим методом — кровяно-капельной РА с пуллорным антигеном.

Возбудители сальмонеллеза поросят — *Salm. typhi suis* или *Salm. cholerae suis*, которые помимо заболевания у свиней могут вызвать пищевые токсикоинфекции у людей. Данная группа сальмонелл патогенна для белых мышей. По антигенной структуре относится к группе C. Возбудителем сальмонеллеза у свиней может быть *Salm. typhimurium*. По О-антигену относится к группе B.

Возбудитель сальмонеллезного (паратифозного) аборта кобыл — *Salm. abortus equi* — открыт в 1893 г., сбраживает маннит, глюкозу, арабинозу, дульцит. Среду Штерн не изменяет. По О-антигену входит в группу B. Для бактериологической диагностики посылают абортированный плод от больного животного, остальное поголовье лошадей обследуют серологически (РА), фекалии исследуют для выявления бактерионосителей. Показателем развития инфекционного процесса у взрослых лошадей является титр сыворотки в РА выше 1 : 400.

Лабораторный диагноз на сальмонеллез разных видов животных ставят на основании результатов бактериологического исследования патологического материала с обязательным изучением у выделенных бактерий морфологических, культурально-биохимических и антигенных свойств.

Вопросы для самопроверки. 1. Патологический материал для диагностики сальмонеллеза поросят, овец. 2. Методы выделения сальмонелл, применяемые среды. 3. Характер роста сальмонелл на среде Эндо и висмут-сульфит-агаре. 4. Методы дифференциации сальмонелл от *E. coli*. 5. Антигенная структура сальмонелл, их серологическая типизация. 6. Характеристика возбудителя сальмонеллеза (паратифа) телят. 7. Бактериологическая диагностика пуллороза.

Возбудитель бруцеллеза впервые был открыт и описан Брюсом (1886), в честь которого этот микроорганизм получил родовое название *Brucella*, а семейство — *Brucellaceae*. В патологии животных имеют значение *Brucella melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*.

Названные виды бруцелл имеют культурально-морфологическое сходство, общие антигены. При гибели, разрушении бруцелл освобождаются эндотоксины. Бруцеллы являются возбудителями инфекционного (контагиозного), хронически протекающего заболевания у животных и человека — бруцеллеза. Болезнь проявляется абортom, а также возможно воспаление суставов, орхиты. Чаще заболевание протекает бессимптомно. Особой патогенностью для человека (и мелкого рогатого скота) обладает *Br. melitensis*. Основные методы диагностики бруцеллеза: бактериологический (особенно при наличии абортomов), серологический и аллергический.

Для бактериологического исследования при жизни животного посылают абортированный плод (или перевязанный с двух сторон желудок плода с содержимым), истечение из родовых путей, плодные оболочки или кусочек плаценты, околоплодную жидкость, молоко. Посмертно (после убоя) в лабораторию направляют трубчатую кость (костный мозг), кусочки печени, почки, селезенки, молочной железы, лимфатические узлы, матку. По мере необходимости отправляют также пробы воды, почвы, подстилки. При взятии материала от животных необходимо соблюдать правила асептики и личной профилактики. Кусочки тканей можно консервировать в 30%-ном глицерине.

Схема бактериологического исследования: микроскопирование препаратов-отпечатков и мазков, посевы на питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя, ее идентификация, биопроба.

М и к р о с к о п и я. Препараты из присланного материала фиксируют; часть из них окрашивают по Граму, часть — по специальному методу (Козловского, Шуляка и др.). По методу Козловского препараты, фиксированные над пламенем горелки, окрашивают свежеприготовленным горячим 2%-ным раствором сафранина (если раствор остыл, его наливают на препарат и подогревают снизу до появления паров). Затем выдерживают 3—4 мин, краску сливают

и докрашивают 1%-ным водным раствором малахитовой (или бриллиантовой) зелени — до 1 мин. По методу Шуляка фиксированный мазок окрашивают карбол-фуксином (1 : 5) 2 мин, слегка промывают и докрашивают 2%-ным водным раствором метиленовой синьки — 3—5 мин.

М о р ф о л о г и я. Бруцеллы мелкие, палочковидной (коккоподобной) формы бактерии, 0,6—1,5 мкм длиной, 0,3—0,5 мкм в диаметре. Споры не образуют. Неподвижны. По Граму красятся отрицательно, по методу Козловского (или Шуляка) — в красный цвет; остальные микробы — в зеленый (или синий) цвет. В препарате располагаются изолированно или небольшими скоплениями.

В ы д е л е н и е ч и с т о й к у л ь т у р ы и к у л ь т у р а л ь н ы е с в о й с т в а . Из различных участков патологического материала пипеткой производят посев на жидкие и плотные питательные среды: глюкозо-печеночные, сывороточные, на картофельные среды с добавлением глицерина, глюкозы; рН среды 7,0—7,2. В первичных посевах рост бруцелл проявляется медленно, необходимо длительно выдерживать в термостате при 37°. Учитывая, что одни виды бруцелл аэробы, а другие — микроаэрофилы (*Br. abortus*), для получения первичных культур посевы помещают в термостат в обычных условиях, другую часть — сначала в эксикатор с повышенным содержанием углекислоты (до 10—20%), а затем уже в термостат. Рост появляется спустя 30—40 дней, самое раннее — на 7—10-й день. По мере адаптации к искусственным средам бруцеллы растут более быстро — 1—2 дня.

На МППА рост проявляется мелкими прозрачными колониями с ровными краями, с голубоватым оттенком; впоследствии сливаются и образуют сплошной мутный сероватый налет. Колонии S- и R-формы. На картофеле нередко колонии пигментированы (коричневого цвета). Типичные колонии пересевают на специальные питательные среды, полученную чистую культуру проверяют на биохимическую активность, а также проводят серологическую идентификацию посредством РА на стекле со специфической сывороткой в разведении 1 : 2—1 : 50.

В МПБ рост вначале в виде равномерного помутнения, в дальнейшем образуется пристеночное кольцо и небольшой осадок. Для получения чистой культуры бруцелл из загрязненного материала рекомендуют делать посев на селективную среду Козловского (МППА с глюкозой, генцианвиолетом и малахитовой зеленью).

Биохимические свойства сравнительно слабо выражены. Желатину и свернутую сыворотку бруцеллы не разжижают, индол не образуют. Сероводород и аммиак образуют лишь в зависимости от вида и штамма. *Br. suis* обильно продуцирует сероводород, а *Br. abortus* — менее интенсивно.

Молоко не свертывают.

Биопроба осуществляется заражением морских свинок, которых предварительно подвергают серологическому контролю. В случае отрицательного результата животным инъецируют подкожно 1—2 мл суспензии из тканей присланного материала — свинка не погибает. Через 8—10 дней у зараженной свинки берут кровь (в случае отрицательного или сомнительного результата кровь берут повторно через 20—30 дней), исследуют по РА в разведении 1 : 5—1 : 10 (до 1 : 80). Положительный результат РА в разведении 1 : 6—1 : 10 указывает на инфицированность морской свинки. По истечении 30—45 дней после заражения свинку убивают и тщательно ее исследуют бактериологически. При отрицательном результате РА морских свинок убивают спустя более длительный период — 6—8 недель, бактериологически исследуют различные ткани и органы, обязательно делают посев из паховых, подчелюстных, шейных, брыжеечных лимфоузлов, печени, селезенки, почек, костного мозга.

Методы дифференциации видов бруцелл (рис. 63). Для дифференциации используют чистые культуры бруцелл, образующие S-форму колоний.

Тесты \ Виды	<i>Br. melitensis</i>	<i>Br. abortus bovis</i>	<i>Br. abortus suis</i>
Фуксин основной 1:25000	+	+	—
Метилвиолет 1:1000000	—	+	—
Пиронин 1:2000000	+	+	—
Тионин 1:25000	+	—	+
Образование H_2S	Не образует или образует весьма незначительное количество	Слабое образование	Интенсивное образование
Отношение к CO_2	Рост в обычных аэробных условиях	Требует повышенного содержания CO_2 (10%)	Рост в обычных аэробных условиях

Обозначения: „+” Рост бруцелл в питательной среде с краской
 „—” Отсутствие роста бруцелл в питательной среде с краской

Рис. 63. Дифференциально-диагностические признаки бруцелл.

Проба с трипафлавином. Бактериологической петлей берут микробную массу 48-часовой агаровой культуры и эмульгируют на предметном стекле в капле трипафлавина, разведенного физиологическим раствором NaCl 1 : 500. Если культура диссоциирована, быстро наступает агглютинация с образованием хлопьев. Недиссоциированная культура при эмульгировании в капле образует однородное помутнение, никаких хлопьев не выпадает.

Окраска колоний кристаллвиолетом. В культуру, выросшую в чашке Петри, пастеровской пипеткой вносят краску в разведении 1 : 2000, приготовленную ex tempore. Через 5 мин после отсасывания краски из чашки колонии просматривают под лупой. Диссоциированные культуры окрашиваются от темно-фиолетового до светло-синего цвета, не диссоциированные — в светло-желтый или светло-зеленый.

Реакция термоагглютинации. 2—3-миллиардную взвесь бруцелл (смыв с агаровой культуры) в пробирке прогревают в водяной бане при 90° в течение 45 мин и оставляют при комнатной температуре. Результат учитывают через 30 мин, затем через 1 ч и окончательно через 24 ч. В диссоциированной культуре четко заметна агглютинация. Если колонии типичны (S-формы) их пересевают в пробирки на скошенный МППА. Выросшую культуру идентифицируют по следующим показателям: 1) отношение к углекислоте — Br. abortus для своего роста нуждается в повышенном содержании CO₂ (до 10%), Br. melitensis и Br. suis хорошо растут в обычных условиях; 2) образование сероводорода — наиболее интенсивно и более продолжительное время проявляется у Br. suis, в меньшей степени — у Br. abortus. Br. melitensis, как правило, не продуцирует сероводород.

Бактериостатический метод дифференциации видов бруцелл основан на отношении к растворам красок, добавленных к питательным средам. В пробирки с красками (каждой в отдельности) — фуксин (1 : 25 000) и тионин (1 : 50 000—1 : 100 000), добавленными к МППА, — высевают чистую культуру бруцелл. На среде с фуксином не растет Br. suis, на среде с тионином не растет Br. abortus. Br. melitensis хорошо растет в присутствии этих красок.

Для серологической диагностики в лабораторию направляют сыворотку крови. Последние исследуют с бруцеллезным антигеном методами РА и РСК.

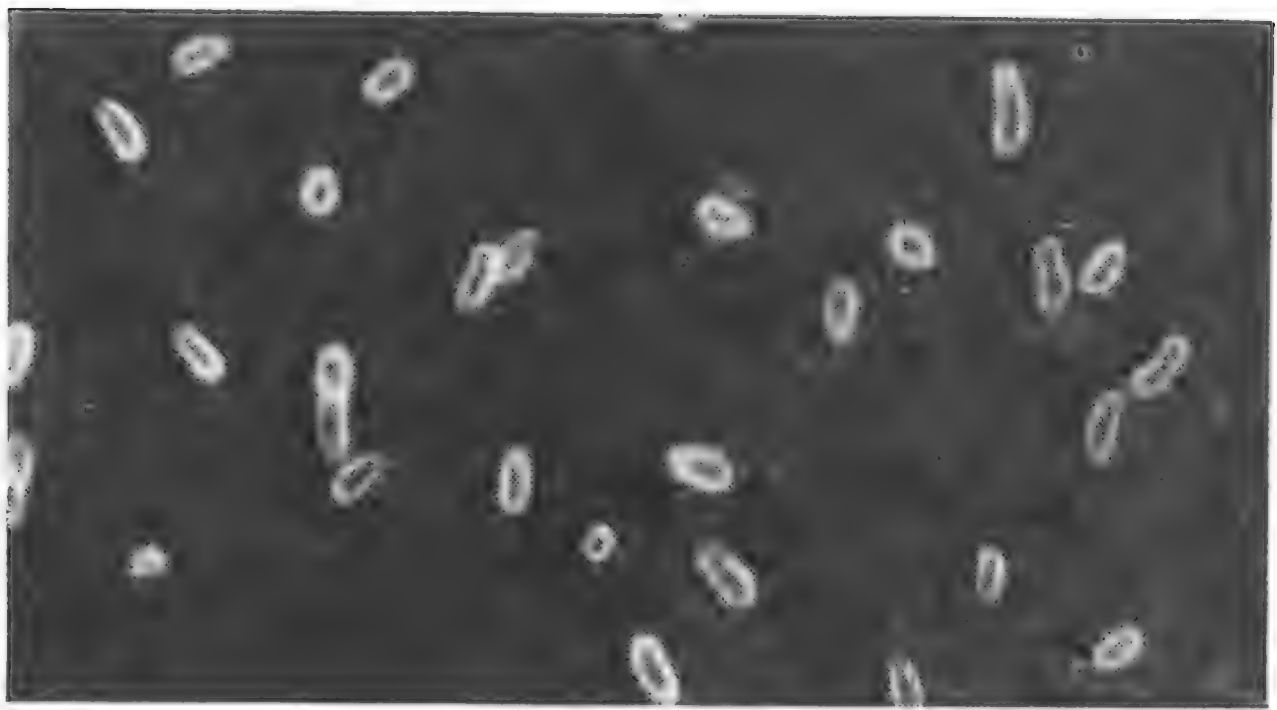


Рис. 64. Бруцеллы. Люминесцентная микроскопия.

В производственных условиях в настоящее время внедряется методика исследования сывороток по методу Кумбса. Все шире используется метод флуоресцирующих антител (рис. 64).

А л л е р г и ч е с к а я д и а г н о с т и к а в хозяйствах основана на применении аллергенов — бруцеллизата, бруцеллогидролизата, бруцеллина. Последние в дозе 0,2 мл вводят внутрикожно и через 24—48 ч учитывают местную реакцию.

Вопросы для самопроверки. 1. Культурально-морфологические и биохимические особенности бруцелл. 2. Патологический материал, отбор его и пересылка в лабораторию. 3. Бактериологический диагноз бруцеллеза. 4. Специальные методы окраски бруцелл, их отношение к окраске по Граму. 5. Методы дифференциации бруцелл и определения диссоциированных культур. 6. Методы серологической диагностики бруцеллеза. 7. Аллергены и аллергическая диагностика бруцеллеза.

ПАСТЕРЕЛЛЫ

Возбудитель пастереллеза — *Pasteurella multocida* (*P. septica*) относится к сем. *Brucellaceae*, роду *Pasteurella*. Название рода дано в честь Пастера, который впервые выделил одного из представителей данной группы (1879) — возбудителя холеры кур. *Past. multocida* вызывает остро протекающее септическое заболевание сельскохозяйственных и диких животных (включая птиц). Пастереллез животных характеризуется наличием множественных геморагий (кровоизлияний) во внутренних органах, на слизистых и серозных оболочках.

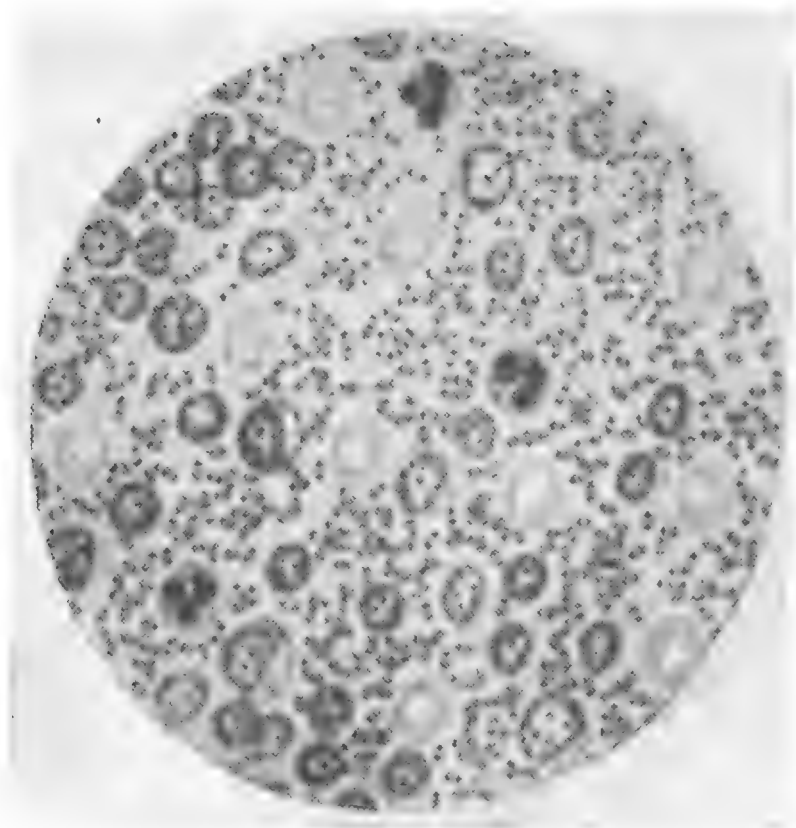


Рис. 65. Пастереллы. Препарат из патологического материала.

Для бактериологического исследования от крупных животных направляют кусочки паренхиматозных органов, трубчатую кость (костный мозг). Трупы мелких животных посылают целиком.

М и к р о с к о п и я. Препараты-отпечатки из тканей и органов высушивают, фиксируют и окрашивают часть препаратов по Граму, часть по Романовскому — Гимза (или по методу Муромцева фуксин-синькой или синькой Леффлера

с последующей обработкой в течение нескольких секунд 1%-ным раствором уксусной кислоты) или разведенным фуксином. Пастереллы — бактерии овоидной формы, величиной от 0,25—0,5 мкм до 2 мкм, неподвижные, споры не образуют. Многие вирулентные свежeweделенные штаммы формируют капсулу. Грамотрицательны. При окраске по методу Муромцева или Романовского — Гимза (или синькой Леффлера) в мазках крови, различных органов окрашивается биполярно, то есть более интенсивная окраска по полюсам клетки, центральная часть окрашена очень слабо (рис. 65).

Ч и с т у ю к у л ь т у р у возбудителя из патологического материала выделяют путем посева на питательные среды МПБ и МПА (рН 7,2—7,4) лучше с добавлением кровяной сыворотки. Оптимальная температура 37°. Аэроб. На жидких средах в первые дни роста отмечают незначительное помутнение среды, затем образуется слизистый осадок, среда просветляется. При встряхивании осадок не разбивается, а поднимается в виде «косички». На МПА пастереллы образуют гладкие, слегка выпуклые серовато-белые колонии S-формы, края ровные, слегка опалесцирующие. Колонии R-формы матовые, с голубоватым отливом, шероховатые с неровными краями.

На МПЖ возбудитель вначале растет отдельными колониями, затем в виде белого стержня без отростков.

Пастереллы ферментируют глюкозу, сахарозу, сорбит и маннит с образованием кислоты без газа (последний кроме бычьих штаммов). Лактозу и дульцит не ферментируют. Антигенная структура изучена недостаточно. Установлено наличие соматического и капсульного антигенов.

П а т о г е н н о с т ь пастерелл определяют при заражении голубей, белых мышей или кроликов чистой культурой или суспензией растертых тканей исследуемого материала. Голубям взвесь инъецируют внутримышечно в количестве 0,3 мл, белым мышам подкожно — 0,2 мл, кроликам подкожно — 0,5 мл. У кроликов перед заражением следует исключить пастереллоносительство. Для этого им в течение трех дней до заражения в каждое носовое отверстие вводят по 2 капли 0,5%-ного водного раствора бриллиантовой зелени. Появляющееся гнойное истечение из носовой полости свидетельствует о бактерионосительстве. При заражении кроликов пастереллами гибель животных наступает через 18—36 ч. Из органов павших животных производят посевы на питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя.

Вопросы для самопроверки. 1. Морфологические и тинкториальные особенности пастерелл. 2. Культуральные свойства пастерелл. 3. Патогенность пастерелл, постановка биопробы. 4. Бактериологическая диагностика пастереллеза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУЛЯРЕМИИ

Возбудитель туляремии — *Francisella tularensis*, открыт Мак-Коем, и Чепиным (1912) в районе Туляре (Калифорния). Подробно изучен Френсисом, в честь которого дано родовое название возбудителю (1921). Относится к семейству Brucellaceae, роду *Francisella*. *Fr. tularensis* вызывает острое инфекционное заболевание животных и человека. Туляремия характеризуется септическим течением, поражением лимфатических узлов (набухание, творожистое перерождение), лихорадкой.

Патологическим материалом для микробиологического исследования при жизни животного служат пунктат из увеличенных (мягких) лимфоузлов, абортированный плод (или органы плода), моча, кал; после гибели животного — печень, почка, селезенка, увеличенные лимфоузлы от крупных животных. Трупы грызунов и других мелких животных направляют целиком.

Схема и порядок проведения исследования: микроскопия препаратов-отпечатков из ткани присланных органов,

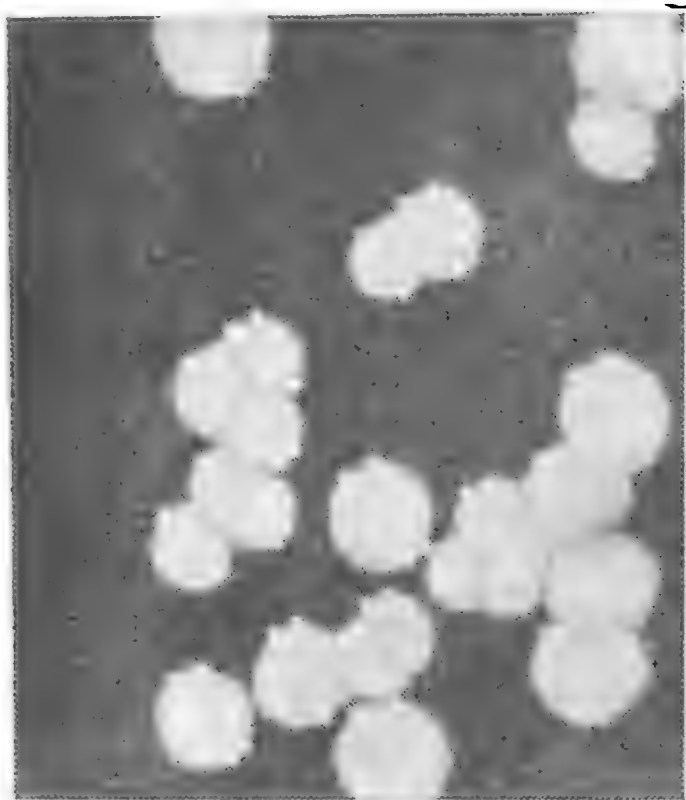


Рис. 66. Колонии возбудителя туляремии.

окрашенных по Граму или по методу Романовского — Гимза или разведенным фуксином, посев на питательные среды для получения чистой культуры возбудителя, его идентификация. По мере необходимости проводят также биопробу (заражение лабораторных животных). Следует учитывать также, что обнаружение возбудителя туляремии в препаратах-отпечатках удастся лишь при обильном обсеменении исследуемого материала.

М и к р о с к о п и я. *Fr. tularensis* — мелкая коккоподобная бактерия в мазках из культуры и тонкая палочка — в препаратах из органов. Величина 0,3 мкм. Споры не образует, неподвижная. В инфицированном организме образует нежную капсулу (не всегда). Грамотрицательна. По Романовскому — Гимза окрашивается в розово-голубой цвет, часто биполярно.

К у л ь т у р а л ь н ы е с в о й с т в а. Возбудитель туляремии аэроб, оптимальная температура роста 37°, рН 6,7—7,4. На средах с кровью через 1—2 дня появляются мелкие колонии беловатого цвета с голубоватым оттенком, круглые, выпуклые, с ровными краями, гладкие, блестящие (рис. 66). На жидких средах растет плохо. При культивировании следует учитывать, что типичной формой колоний является гладкая S-форма, обладающая Vi- и O-антигенами, вирулентная и иммуногенная. R-форма *Fr. tularensis* содержит лишь O-антиген. Авирулентна. При серологической диагностике учитывают наличие в бактериальной клетке антигенов, общих с бруцеллами. Для культивирования *Fr. tularensis* применяют специальные питательные среды. Наиболее часто пользуются желточной средой Мак-Коя, шоколадным агаром Фрэнсиса, кровяной средой Емельяновой и др.

Среда Мак-Коя: на 60 частей куриных желтков добавляют 40 частей стерильного физиологического раствора (дистиллированную воду для физиологического раствора подщелачивают до рН 7,0—7,2). Для свертывания среды ее выдерживают при

80° один часа. Посев на среду производят методом отпечатков: кусочек органа обжигают, разрезают стерильными ножницами и поверхность разреза прикладывают к поверхности среды. Рост наблюдают уже через 18—24 ч, максимальный рост через 2—3 дня. При слабом посеве отмечают редко расположенные колонии на 3—6-й день.

Среда Фрэнсиса: к МПА с 1% пептона и 0,5 NaCl (pH 7,3) добавляют 0,1% цистина и 1% глюкозы, кипятят несколько минут, затем охлаждают до 50° и добавляют 10% дефибрированной стерильно полученной крови кролика.

Среда Емельяновой: в рыбно-дрожжевой агар вносят 0,1% цистина и 1% глюкозы. Затем агар расплавляют, охлаждают до 45° агара, к нему добавляют 10% дефибрированной крови, разливают по чашкам Петри или в пробирки. Данная среда более чувствительна, пригодна для получения изолированных колоний возбудителя туляремии.

Биохимические свойства выражены слабо, но на специальных питательных средах с пониженным содержанием белка *Fr. tularensis* ферментирует с образованием кислоты без газа — глюкозу, мальтозу, маннозу, глицерин, декстрин. Обладает протеолитическими свойствами — расщепляет белки с образованием сероводорода. Индол не образует.

Биопроба основана на заражении белых мышей и морских свинок суспензией растертых тканей патологического материала подкожно, в брюшную полость (в дозе 0,5 мл) или втиранием в кожу. Белые мыши погибают на 3—4-й день (иногда 8—12-й), морские свинки — через 4—5 дней. Если материал инфицирован незначительно, гибель возможна на 8—15-й день. При вскрытии павших лабораторных животных отмечают некротические очаги в легких, селезенке, печени, лимфатических узлах; их исследуют бактериологически.

Выделенную культуру идентифицируют пробирочным методом РА. В качестве антигена используют двухсуточную культуру, выращенную на среде Мак-Коя. Микробную массу снимают петлей (смыть нельзя), суспендируют в физиологическом растворе, доводят концентрацию до 5 млрд. микробных клеток в 1 мл по стандарту для тулярийного микроба. Микробную взвесь в дозе 0,5 мл вносят в пробирки со специфической сывороткой в разных разведениях не менее чем до 1 : 2000, встряхивают, помещают на 2 ч в термостат, затем оставляют при комнатной температуре на 20—22 ч. Положительным результатом считают

четко выраженную агглютинацию при полной прозрачности жидкости над агглютинатом.

Для серологической диагностики и применяют РСК, как очень чувствительную, и реакцию precipitation для быстрой диагностики заболевания грызунов и пушных зверей. В качестве антигена готовят экстракт из измельченных тканей поступившего в лабораторию трупа.

Вопросы для самопроверки. 1. Морфология, тинкториальные свойства и классификация возбудителя туляремии. 2. Патогенные свойства возбудителя туляремии. 3. Питательные среды, применяемые для культивирования *Fr. tularensis*. 4. Культуральные и биохимические свойства возбудителя туляремии. 5. Бактериологическая и серологическая диагностика туляремии.

ВОЗБУДИТЕЛЬ РОЖИ СВИНЕЙ

Возбудитель рожи свиней — *Erysipelothrix rhusiopathiae* — открыт Пастером и Тьюе (1882), относится к семейству *Corynebacteriaceae*, роду *Erysipelothrix*. Заболевание у свиней отмечают в возрасте от трех месяцев до 1 года, у ягнят — старше 3—4 недель и реже — у других видов животных. К возбудителю восприимчив и человек. Рожа свиней протекает в септической форме, внешне проявляется образованием красных пятен на коже (крапивница), лихорадкой.

Патологическим материалом для бактериологической диагностики служит труп животного или кусочки органов — печени с желчным пузырем, селезенки, почки, трубчатая кость. При подозрении на хроническую форму исследуют кровь из сердца, а также эндокард. При наличии артритов исследуют суставную жидкость. Кусочки органов консервируют в 30—40%-ном водном растворе глицерина или насыщенном растворе поваренной соли. Трубчатую кость, очищенную от мягких тканей, обертывают марлей, пропитанной 2—3%-ным раствором фенола. Препараты-отпечатки из патологического материала окрашивают по Граму. Для люминесцентной микроскопии из паренхиматозных органов готовят суспензию (взвесь растертой ткани) на физиологическом растворе NaCl. Тонкие мазки из этой суспензии красят флюоресцирующей сывороткой. Пастеровской пипеткой делают посев на МПБ, МПА, МПЖ, инкубируют при 37°. Выросшую культуру на бульоне исследуют на подвижность и используют для определения биохимических свойств. Смыв агаровой культуры используют в качестве антигена для РА. Суспензией из тка-

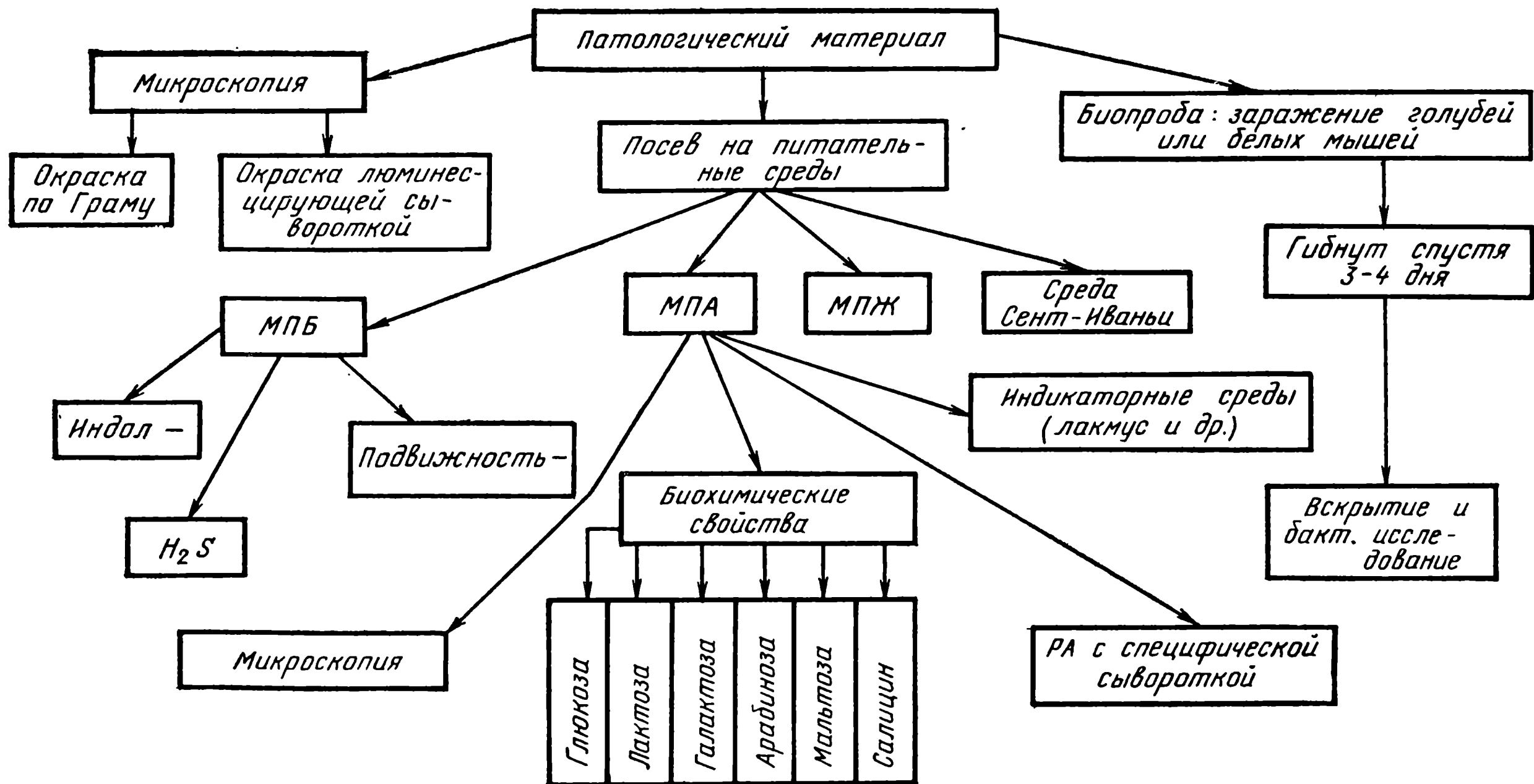


Рис. 67. Схема бактериологического исследования на рожу свиней.

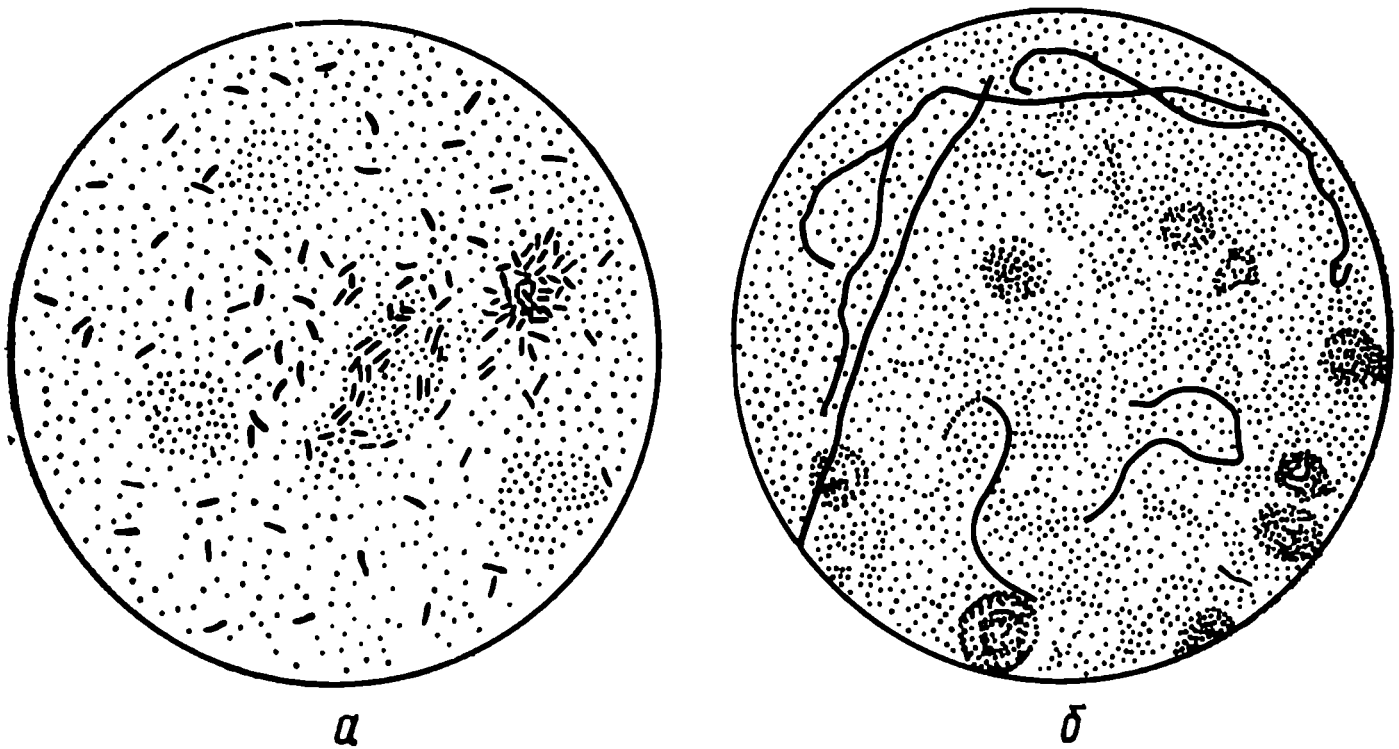


Рис. 68.

Бактерии рожи свиней (а); б — образование нитей на клапанах сердца при хронической форме болезни.

ней органов заражают голубя или белую мышь. Павших животных вскрывают и исследуют бактериологически (рис. 67).

М о р ф о л о г и я. Бактерия рожи свиней — тонкая, прямая или слегка изогнутая палочка размером 2—2,5 мкм в длину и 0,2 мкм в диаметре. Бактерии располагаются одиночно, попарно или скоплениями (рис. 68). При хроническом течении болезни в мазках из пораженных сердечных клапанов (эндокарда) или других органов возбудитель имеет вид длинных нитей, иногда переплетающихся, но неветвящихся. По Граму окрашивается положительно, споры и капсулы не образует. Неподвижен. При люминесцентной микроскопии возбудителя рожи определяют по наличию специфического свечения морфологически типичных микробных клеток интенсивностью не ниже чем на три креста (+++). При сомнительном или отрицательном результате диагноз уточняют люминесцентной микроскопией выросших на средах культур, выделенных из патологического материала.

К у л ь т у р а л ь н о - б и о х и м и ч е с к и е с в о й с т в а. Возбудитель рожи неприхотлив к питательным средам. Для оптимальных условий роста нужны среды содержащие 1—2% глюкозы или кровяную сыворотку, рН 7,2—7,6, температура 37°. Бактерии рожи свиней аэробы (или факультативные анаэробы). В жидкой питательной среде через 24—48 ч образуется едва заметное помутнение

Рис. 69. Рост возбудителя рожи свиней по уколу в желатине.

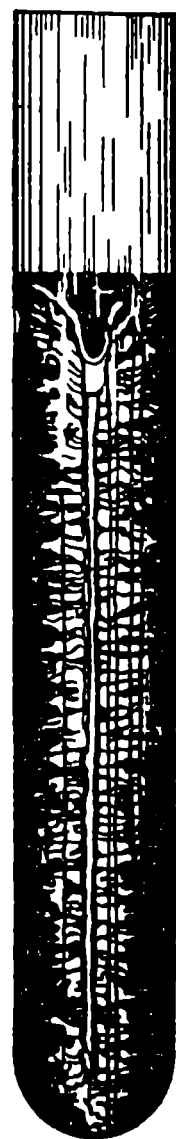
и незначительный осадок, который при встряхивании распределяется волнообразно, напоминающая муаровую ткань (ленту).

На плотной среде (МПА) возбудитель рожи растет в виде очень мелких росинчатых прозрачных колоний. Типичной является гладкая S-форма, колонии с ровными краями, но встречаются измененные О- и R-формы, особенно при хроническом течении. Для патогенных штаммов характерна S-форма колоний. В МПЖ по уколу посева (рис. 69) через несколько дней появляется рост в виде «ершика». Желатину не разжижает.

Пышный рост наблюдают в полужидком агаре (0,1—0,15%). Элективной средой для выделения рожистого микроба является среда Сент-Иваньи (агаровая среда, содержащая 0,1% кристаллвиолета и 1% азида натрия). Полученную культуру микроскопируют как в обычном световом микроскопе, так и люминесцентным методом, идентифицируют по культурально-биохимическим свойствам и пластинчатым методом РА с позитивной сывороткой в разведении 1 : 50.

Бактерия рожи свиней обладает слабо выраженной биохимической активностью — не сбраживает салицин, не образует каталазы. С образованием кислоты и газа сбраживает глюкозу, лактозу, галактозу. Образует сероводород. По антигенной структуре бактерии рожи свиней относят к трем серологическим типам: А, В и N. Серотип N обладает общим видовым антигеном, серотипы А и В отличаются своими гаптенами. На основании серологических исследований (РА, РП, РГА) штамм бактерии рожи свиней относят либо к серотипу А (более вирулентному), либо к серотипу В — менее вирулентному для свиней, обладающему выраженными иммуногенными свойствами.

П а т о г е н н о с т ь выделенной культуры возбудителя определяют заражением лабораторных животных — голубей, белых мышей. Голубей заражают внутримышечно (чаще в грудную мышцу) в дозе 0,2—0,3 мл, гибель наступает через 3—6 дней; белых мышей — подкожно в дозе 0,1—0,2 мл, гибель наступает через 2—4 дня. Наблюдение



за зараженными животными — 6—7 дней. При заражении белых мышей следует исключить *Erysipelothrix murisepticum* — возбудителя септицемии мышей, по морфологическим и культуральным свойствам сходным с бактерией рожи свиней. *E. murisepticum* непатогенна для голубей.

При бактериологических исследованиях на рожу свиней следует учитывать возможность обнаружения возбудителя листериоза, имеющего морфологическое, тинкториальное и культуральное сходство с бактерией рожи свиней (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Дифференциация рожи свиней и листериоза

Показатели	Бактерии рожи свиней	Возбудители листериоза
Подвижность	Неподвижен	Подвижен в молодой 6—12-часовой культуре при 22—28°
Сбраживание салицина	Не сбраживает	Сбраживает
Образование сероводорода	Образует	Не образует
Конъюнктивальная проба у морских свинок	Отрицательная	Положительная
Патогенность для морской свинки	Непатогенен	Патогенен
Проба на каталазу	Отрицательная	Положительная
Отношение к средам с индикаторами — лакмусом, метилротом	Не изменяет цвет	Изменяет цвет
РА с позитивной антирожистой сывороткой	Положительная	Отрицательная
РА с позитивной антилистериозной сывороткой	Отрицательная	Положительная

Вопросы для самопроверки. 1. Латинское название возбудителя рожи свиней, его основные морфологические, тинкториальные и культуральные свойства. 2. Патологический материал, правила взятия и пересылки в лабораторию для бактериологической диагностики рожи свиней. 3. Бактериологический диагноз рожи свиней. 4. Дифференциация возбудителя рожи свиней от возбудителя листериоза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛИСТЕРИОЗА

Возбудитель листериоза — *Listeria monocytogenes* — открыт Марреем (1926). Назван возбудитель в 1940 г. (Пири) в честь Листера. Возбудитель относится к семейству *Corynebacteriaceae*, роду *Listeria*. Вызывает заболевание грызу-

нов, свиней, крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, некоторых видов пушных зверей, птицы. Восприимчив к листериозу и человек. Болезнь протекает в септической форме, но нередко характеризуется проявлением расстройства центральной нервной системы.

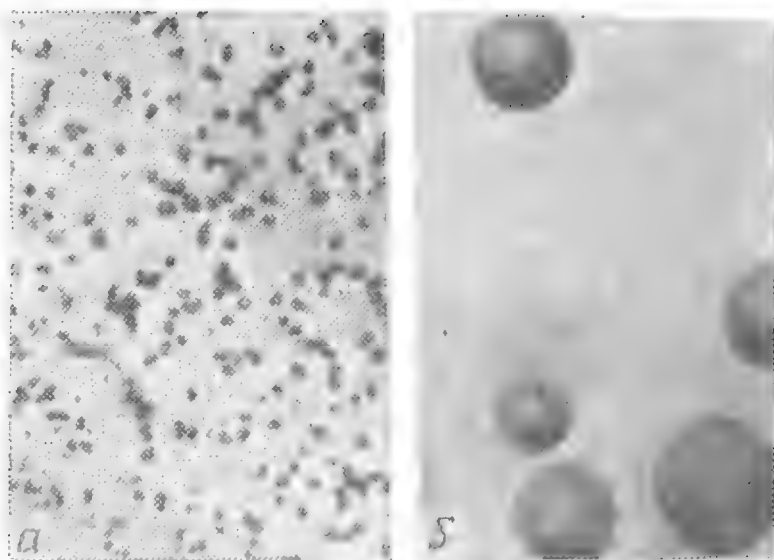


Рис. 70. Листерии:

а — в чистой культуре; *б* — колонии на МПА (×35).

Лабораторная диагностика листериоза осуществляется, как правило, бактериологическими и серологическими методами.

Для бактериологического исследования мелкого животного посылают свежий труп или паренхиматозные органы и голову, от трупов крупных животных (лошадь, крупный рогатый скот, овца) — головной мозг и кусочки паренхиматозных органов, а в случае аборта — абортированный плод или его органы; при наличии мастита — пробы молока из пораженных долей вымени.

Бактериологическое исследование включает обычную микроскопию препаратов-отпечатков, окрашенных по Граму, и люминесцентную микроскопию с применением флуоресцирующей сыворотки. Посевы для выделения культуры производят из всех присланных тканей и органов на МПА, МПБ, МППБ, МППА с 1% глюкозы и 2—3% глицерина, переваром Мартена. Заражают морских свинок, белых мышей, голубей.

Морфология. Возбудитель — мелкая полиморфная палочка длиной 0,5—2,0 мкм, хорошо красится всеми анилиновыми красками. Грамположительна, подвижна, споры и капсулы не образует (рис. 70).

Культуральные свойства. Аэроб (факультативный анаэроб), оптимальный pH 7,2—7,4, температура 37°. Рост отмечают через 24—48 ч. В жидкой среде рост характеризуется едва заметным помутнением ее с образованием слизистого осадка. На плотных средах рост проявляется в виде мельчайших росинчатых колоний. На кровяном агаре вокруг колоний образуется узкая зона гемолиза. Типичные колонии на плотных средах пересевают для получения чистой культуры. Биохимическую активность

культуры изучают на средах с углеводами. Возбудитель листериоза сбраживает с образованием кислоты без газа глюкозу, рамнозу, салицин. Не сбраживает дульцит, инулин, сорбит. Индикаторные среды (с лакмусом, метил-ротом) обесцвечивает.

Листерии представлены двумя основными серотипами: «грызунов» и «жвачных». Они имеют соматические О- и жгутиковые Н-антигены. О-антиген содержит 4 термолабильных (I, II, IV, V) и вариабельный (III) антигены; Н-антиген содержит антигены А, В, С, D.

Б и о п р о б а. К листериозу восприимчивы белые мыши (массой не менее 18,0), морские свинки и голуби. Заражают их подкожно выделенной культурой или взвесью растертой ткани органов, присланных в лабораторию. Однако у морских свинок для заражения часто пользуются конъюнктивальной пробой: на конъюнктиву глаза наносят две капли испытуемой культуры, затем слегка массируют веки ватным тампоном. Вирулентные штаммы листерий на 2—4-й день вызывают гнойный кератоконъюнктивит. При подкожном заражении инъецируют суспензию тканей органов в дозе 0,3—0,5 мл. Обязательно используют суспензию головного мозга. При положительной биопробе животные гибнут через 2—6 суток. Для повышения эффективности биопробы белым мышам за 2—3 ч до заражения внутрибрюшинно в дозе 5 мг вводят кортизон. При вскрытии обнаруживают множественные некротические очажки в печени, селезенке, почках. Срок наблюдения за зараженными животными — 8 суток (если не погибнут раньше).

Паренхиматозные органы павших животных исследуют бактериологически. Выделенную чистую культуру идентифицируют (см. табл. 4). Для идентификации культуры используют также серологический метод — РА на стекле со специфической антилистериозной сывороткой в разведении 1 : 50. Антигеном в реакции служит суспензия (смыв с агара) суточной культуры на физиологическом растворе (около 10—15 млрд. микробных тел в 1 мл). На чистое обезжиренное предметное стекло наносят одну каплю поливалентной сыворотки и отдельно каплю физиологического раствора; к ней добавляют одну каплю антигена, быстро перемешивают бактериологической петлей или запаянным концом пастеровской пипетки, затем плавно покачивают круговыми движениями. Учет в течение трех минут. Положительный результат — появление хлопьев в капле с сывороткой, отрицательный — в контроле (в капле с физио-

логическим раствором без сыворотки) равномерное помутнение без хлопьевидного агглютината. Запоздалую реакцию не учитывают. Серотип идентифицируется при использовании типовых сывороток. Видовую принадлежность возбудителя устанавливают также просматриванием препаратов-мазков из культуры или непосредственно из патологического материала, обработанных флуоресцирующей специфической сывороткой.

Для серологической диагностики направляемые в лабораторию пробы крови (или сыворотки) от животных из хозяйств с специфическим антигеном исследуют методом РСК.

Вопросы для самопроверки. 1. Виды животных, восприимчивых к листериозу. 2. Патологический материал и бактериологическое исследование его при листериозе. 3. Питательные среды и культуральные свойства листерий. 4. Морфологические, тинкториальные свойства листерий; критерии, дифференцирующие листерии от бактерий рожи свиней. 5. Биохимическая и серологическая идентификация листерий. 6. Серологическая диагностика листериоза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ САПА

Возбудитель сапа — *Pseudomonas mallei* — открыт Леффлером и Шютцем (1882). Относится к семейству *Brucellaceae*. Вызывает заболевание целлюнокопытных животных (лошадь, осел, мул, лошак), а также отмечены случаи и у хищных животных — львов, тигров, рысей. К сапу восприимчив и человек. Сап протекает чаще в хронической форме и характеризуется развитием сапных узелков, склонных к казеозному распаду. Клинически может проявляться серозно-гнойным истечением из носовых отверстий, образованием язв на слизистой оболочке носовой перегородки, увеличением подчелюстных лимфоузлов. При кожной форме сапа образуются язвы с ровными краями и саловидным дном. Заражение происходит контактным путем. При подозрении на сап следует строго соблюдать правила личной профилактики и техники безопасности, как положено в работе с особо опасными материалами.

Для бактериологического исследования при жизни животного посылают гнойный экссудат из язв, истечения из носа, посмертно (после убоя) — участки внутренних органов (легких, печени, лимфоузлов, селезенки), пораженные сапными узелками. Гной из язв берут стерильным ватным тампоном и помещают его в пробирку. Из присланного материала готовят препараты-

мазки, окрашивают их по Граму, а также синькой Леффлера или по Романовскому — Гимза. Для выделения возбудителя делают посевы на МПА, МПБ с 2,5% глицерина, рН 7,0—7,2, а также на глицеринизированный картофель. Культивируют при 37°. Аэроб. Для биологической пробы используют морскую свинку (самца) или кошку.

При микроскопии препаратов-отпечатков или мазков обнаруживают одиночно расположенные полиморфные грамтрицательные палочки. При окраске синькой Леффлера или по Романовскому — Гимза в клетках хорошо видна зернистость. Бактерия сапа неподвижна, споры и капсулу не образует.

Рост на питательных средах появляется на 1—2-е сутки, иногда позже.

На МПА с глицерином вырастают слизистые, вязкие колонии, серовато-белого цвета с перламутровым оттенком. В глицериновом МПБ растет в виде равномерного помутнения, по мере дальнейшего роста культуры образуется осадок, который при встряхивании пробирки поднимается штопорообразно. Встречаются штаммы, растущие в жидкой среде с образованием пленки.

На глицеринизированном картофеле *P. mallei* растет характерно: сначала появляются мелкие колонии в виде капелек с желтоватым оттенком, разрастаясь, колонии сливаются и образуют сочный слизистый «медовый» налет. В первые три дня цвет микробной массы янтарно-желтый, затем он становится буро-коричневым. В мазках из культуры часто наблюдают наряду с короткими палочками цепочки, состоящие из 4—8 клеток.

Биопроба основана на внутрибрюшинном заражении морской свинки взвесью в физиологическом растворе растертого патологического материала. На 3—4-й день после заражения развивается характерный для сапного процесса клинический признак — гнойный орхит (и перiorхит) — скротальный феномен (или реакция Штрауса) (рис. 71). На месте инъекции развивается и воспалительный процесс с образованием язвы. В случаях возможного загрязнения исследуемого материала посторонней микрофлорой заражение проводят подкожно в дозе 3—5 мл. Гибель животных наступает на 8—15-е сутки.

При развитии скротального феномена, не ожидая гибели свинки, ее убивают, вскрывают, бактериологически исследуют, выделяют чистую культуру из очагов поражения внутренних органов и семенников.

К сапному микробу чувствительны кошки, но с ними работать опасно, так как при развитии сапного процесса у кошки поражаются верхние дыхательные пути и при чихании, фыркании воспалительный экссудат распространяется в окружающую среду и представляет опасность заражения работающего персонала. Поэтому кошек заражают в исключительных случаях, имея на это специальное разрешение.

При отсутствии клинических признаков сапа массовое обследование лошадей осуществляют методом РСК, а в условиях хозяйства — аллергическим методом. РСК выявляет активную форму течения сапного процесса.

Все формы данного инфекционного процесса (инкапсуляция, обызвествление очагов) выявляются аллергической пробой, обычно глазной маллеинизацией.

Вопросы для самопроверки. 1. Патологический материал и бактериологическое исследование его при сапе. 2. Морфологические и тинктерные свойства *P. mallei*. 3. Питательные среды для культивирования бактерии сапа, ее культуральные свойства. 4. Особенности биопробы при диагностике сапа. 5. Серологический и аллергический методы диагностики сапа.

ВОЗБУДИТЕЛЬ МЕЛИОИДОЗА

Возбудитель мелиоидоза — *Pseudomonas pseudomallei* — относится к семейству *Pseudomonaceae*, роду *Actinobacillus*. Открыт Уайтмором (1911). Вызывает сапоподобное заболевание, встречающееся нечасто, но зарегистрированное во многих странах различных континентов. К мелиоидозу восприимчивы мелкий рогатый скот, свиньи, обезьяны, собаки, кошки, кролики, морские свинки. Восприимчив и человек. Из организма больного возбудитель выделяется во внешнюю среду с носовым гнойно-слизистым истечением, с отделениями при кожных поражениях, с мочой и фекалиями. Переносчиками возбудителя могут быть кровососущие насекомые. Продолжительность болезни 8—30 дней,

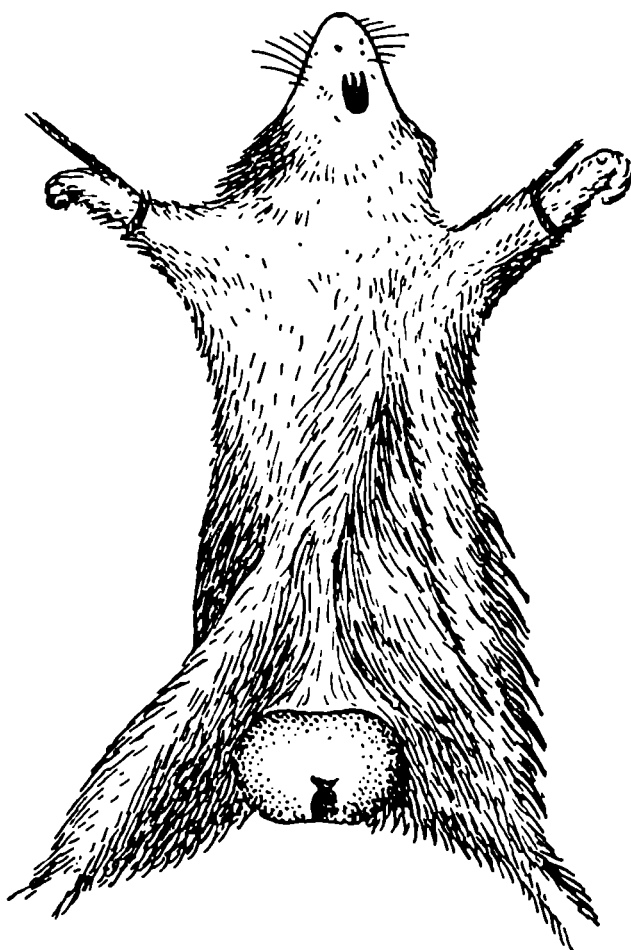


Рис. 71. Орхит у самца морской свинки после заражения бактерией сапа.

как правило, с летальным исходом. Птицы и холоднокровные животные не восприимчивы.

Патологический материал для лабораторной диагностики: трупы мелких животных, экссудаты, кусочки паренхиматозных органов крупных животных (если нельзя труп послать целиком). Готовят препараты, часть окрашивают по Граму и Романовскому — Гимза, часть используют для люминесцентной микроскопии. Производят посев на МПБ и МПА с глицерином. Эмульсией из патматериала заражают морскую свинку или крысу, кролика.

М о р ф о л о г и я. Возбудитель мелиоидоза палочковидной формы, размером 2—6 мкм, в диаметре 0,5—1 мкм. Имеет сходство с бактерией сапа, полиморфный. В молодой культуре встречаются цепочки длиной 15—20 мкм. В мазках из старых культур имеют форму коккобактерий. Споры и капсулу не образует. Хорошо красится всеми анилиновыми красками, грамотрицателен. В мазках из патологического материала возможна биполярная окраска. Подвижный лофотрих.

К у л ь т и в и р о в а н и е хорошо удается на средах с глицерином, рН 6,8—7,0 при температуре 37°, в аэробных условиях. Через сутки на МПА с 5% глицерина появляются R-, S- и M-формы колоний, сочные, слизистые. R-формы складчатые, на поверхности с зубчатыми неровными краями. В МПБ с глицерином рост проявляется равномерным помутнением среды с образованием толстой морщинистой пленки. При старении культура приобретает коричневую окраску. Хорошо растет на глицеринизированном картофеле и кровяном агаре. Встречаются гемолитические штаммы.

Возбудитель мелиоидоза расщепляет с образованием кислоты без газа глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, ксилозу, маннит, дульцит, декстрин. Обладает протеолитическими свойствами — ферментирует (разжижает) желатину, яичный белок, пептонизирует молоко.

А н т и г е н н а я с т р у к т у р а возбудителя мелиоидоза характеризуется наличием соматического O- и жгутикового H-антигенов. O-антиген имеет родство с антигенами бактерии сапа и сальмонелл, то есть не обладает специфичностью. У *P. pseudomallei* обнаружены K- и M-антигены, обладающие типоспецифичностью, что используют в серологической идентификации методом РА с соответствующими типоспецифическими антисыворотками.

Морских свинок, крыс и кроликов заражают суспензией присланного материала или выделенной из него бактериальной культурой. После гибели животных трупы их вскрывают и исследуют бактериологически. Выделенную чистую культуру идентифицируют по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Дифференциация возбудителей сапа и мелиоидоза

Pseudomonas mallei	Pseudomonas pseudomallei
Сегментированность при окраске Неподвижен Колонии серо-белого цвета Желатину не разжижает Медовый налет на картофельной среде Крысы невосприимчивы Кролики мало чувствительны	Биполярность Подвижен Колонии кремового цвета Кратерообразное разжижение желатины Обильный налет кремового цвета Крысы очень восприимчивы Кролики восприимчивы

Серологическую диагностику осуществляют методом РА с сыворотками больных хроническим мелиоидозом, но антигенное родство возбудителя с бактерией сапа снижает практическую значимость РА.

Вопросы для самопроверки. 1. Возбудитель мелиоидоза, его культурально-морфологические особенности. 2. Патологический материал и бактериологическое исследование его при мелиоидозе. 3. Особенности постановки биопробы. 4. Антигенное строение *P. pseudomallei*, его значение в серологической диагностике мелиоидоза. 5. Дифференцирование возбудителей сапа и мелиоидоза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis*, выделен и изучен отечественным ученым Брауэлем (1857). Сибирская язва — заразное остро протекающее заболевание многих видов животных и человека. Возбудитель сибирской язвы относится к порядку *Eubacteriales*, семейству *Bacillaceae*.

Для лабораторного исследования от павших животных отрезают ухо с той стороны, на которой лежал труп. Прежде чем ухо отрезать, на него накладывают две лигатуры: одну ближе к голове, у основания уха,

другую — отступя на 1 см от первой, затем между ними делают разрез. Поверхность разреза на трупе прижигают раскаленным металлическим предметом (шпателем) или химическими средствами — кристаллическим марганцовокислым калием, фенолом, формалином. Отрезанное ухо завертывают в пергаментную бумагу или целлофан, упаковывают в непротекающий деревянный или железный ящик (пенал, коробку).

Помимо уха, патматериалом может служить кровянисто-пенистое истечение из естественных отверстий трупа (носовое истечение, из глаз, рта, анального отверстия). Истечения наносят на чистое стекло в виде толстого мазка, сверху накрывают другим стеклом, завертывают в пергаментную бумагу или целлофан, упаковывают в коробку. Кровянистые истечения можно взять путем пропитывания кусочка мела. В случаях, когда труп вскрыт или подозрение на сибирскую язву появилось при разделке туши после убоя животного, для бактериологического исследования направляют кровь из сердца, кусочки паренхиматозных органов, лимфоузлы. Патологический материал помещают в банки с притертой пробкой или целлофановые мешки, обертывают тканью, смоченной дезинфицирующим раствором, упаковывают и срочно с нарядным и сопроводительным письмом отсылают в лабораторию.

П о р я д о к б а к т е р и о л о г и ч е с к о г о и с с л е д о в а н и я (рис. 72). Соблюдая правила личной профилактики, в лаборатории ухо фиксируют в кюветке, подрезают и отпрепаровывают в виде треугольника кожу снаружи уха, где она более подвижна. Лоскут кожи откидывают и к подкожной клетчатке прикладывают предметные стекла — готовят препараты-отпечатки. Кляч-препараты фиксируют и окрашивают по Граму и специально по Михину (или по Романовскому — Гимза азур-эозином или по Ольту сафранином). Подкожную клетчатку мелко нарезают маленькими стерильными ножницами и растирают в стерильной ступке с песком и физиологическим раствором. Данную тканевую взвесь используют для посева на питательные среды и заражения лабораторных животных. Насасывание в пастеровскую пипетку каплей межтканевой жидкости подкожной клетчатки, крови и приготовленной взвеси производят с помощью резиновой груши. Аналогично исследуют и другой материал.

М и к р о с к о п и я. *Bac. anthracis* — палочковидной формы, в препаратах из патологического материала распо-

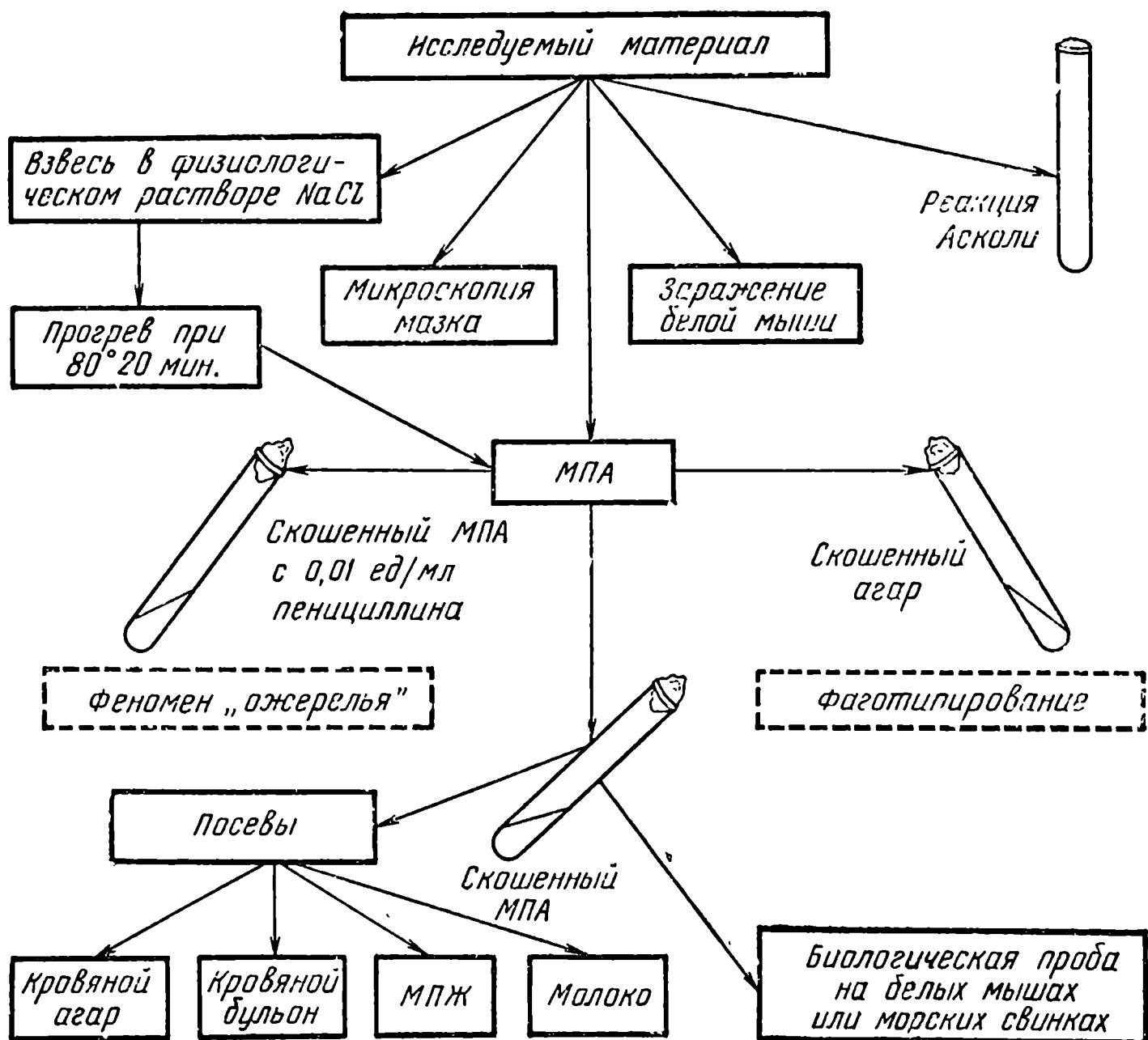


Рис. 72. Схема исследования патологического материала для обнаружения возбудителя сибирской язвы.

лагается короткими цепочками по несколько клеток или одиночно. Прилегающие друг к другу концы бацилл кажутся обрубленными, наружные — закругленные. Окрашиваются грамположительно. В организме формирует капсулу (рис. 73). В препаратах-мазках из культуры характерно расположение длинными нитевидными цепочками (стрептобациллы). В культурах, почве, воде, кормах формирует стойкую форму — спору. Для спорообразования необходим доступ кислорода, температура в пределах 12—42°. Бацилла без жгутиков, неподвижна.

Культуральные свойства. К питательным средам неприхотлив. Аэроб. Оптимальная температура 35—37°. Из приготовленной тканевой взвеси пипеткой делают посев в МПБ, МПА. В МПЖ засевают в столбик среды уколom. В жидкой среде рост проявляется на дне пробирки в виде рыхлого ватообразного осадка при сохранении прозрачности бульона. На МПА — шероховатые R-формы колонии и края характерно волнистые, локоноподобные



Рис. 73. *Bac anthracis* с капсулой (препарат из селезенки).

(рис. 74). В МПЖ растет по уколу, но неодинаково интенсивно: ближе к поверхности (больше доступ кислорода) рост обильнее в виде ответвлений от стержня-укола посева. По мере углубления рост ухудшается, ответвления становятся короче, образуется «елочка» вершиной вниз; спустя 2—3 дня желатина медленно разжижается в виде воронки

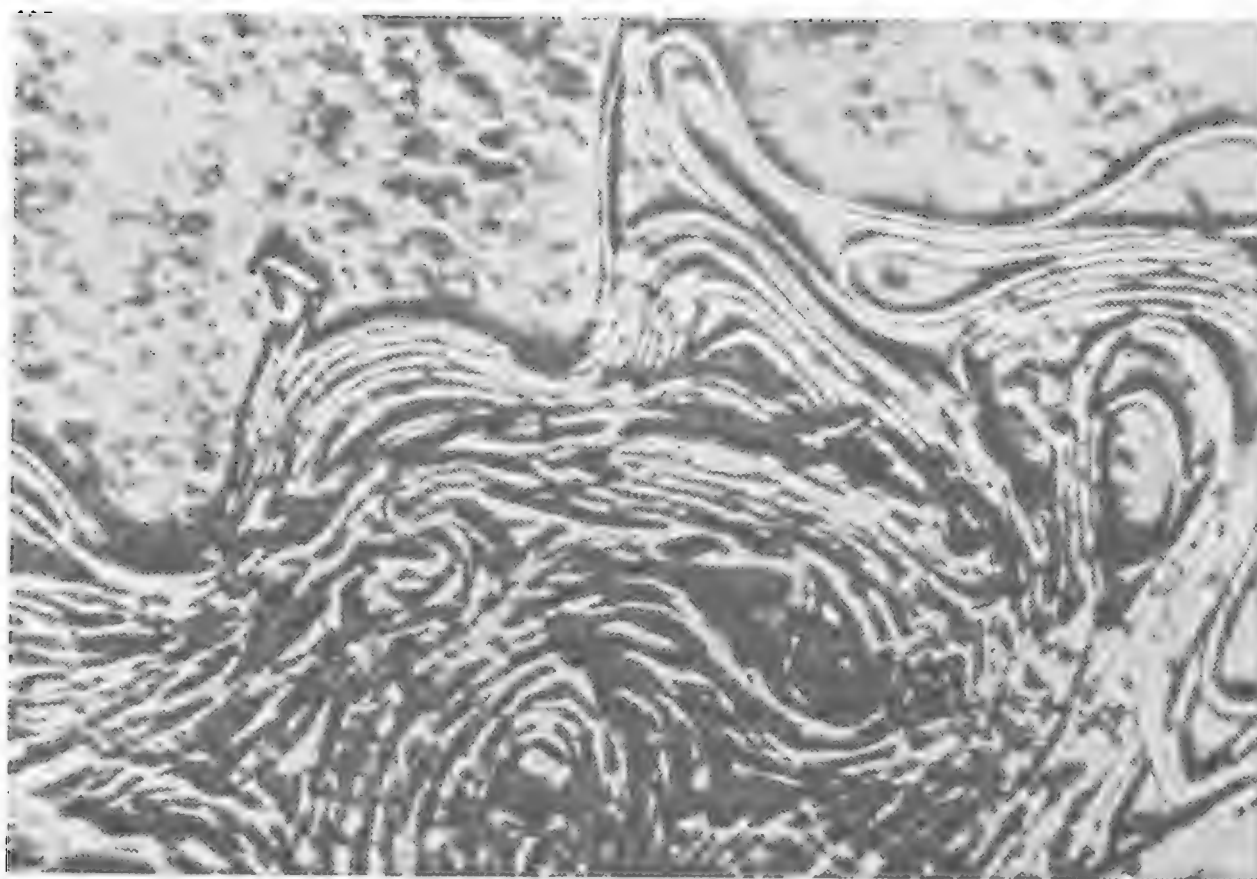


Рис. 74. Край колонии *Bac. anthracis*.

(пептонизируется). На кровяном агаре гемолиза не вызывает, молоко свертывает через 2—4 дня. Сгусток казеина пептонизируется.

П а т о г е н н о с т ь устанавливают биопробой на белых мышах, морских свинках или кроликах. Заражают подкожно непосредственно тканевой взвесью или выросшей культурой в дозе 0,1 мл для мыши, 0,2 мл для морской свинки и 0,3 мл для кролика. Гибель наступает через 1—3 дня. Павших животных вскрывают и исследуют бактериологически.

Чтобы обнаружить *Bac. anthracis* в исследуемом материале и идентифицировать выделенную культуру, используют также сибиреязвенные фаги (гамма-фаг, фаг ВИЭВ). На засеянную поверхность исследуемой культуры (на поверхность агара) наносят каплю сибиреязвенного фага и инкубируют при 37°. В случае гомологичности культуры и фага по следу капли уже через 6—8 ч образуется прозрачная дорожка лизиса; по бокам дорожки рост засеянной культуры (рис. 75).

Для идентификации *Bac. anthracis* прибегают к феномену или реакции «ожерелья». Суть заключается в том, что под действием малых концентраций пенициллина в агаровой среде (0,01—0,5 ед/мл) бациллы сибирской язвы приобретают форму сферопластов в виде шаров, напоминающих ожерелье (рис. 76).

Для дифференцирования *B. anthracis* от спорообразующих сапрофитных бацилл применяют МФА.

С е р о д и а г н о с т и к а. В несвежем, разложившемся патологическом материале бактериологическая диагностика неосуществима. В таких случаях применяют реакцию преципитации. Антигеном для реакции (преципитином) служит вытяжка из тканей органов павшего животного (в том числе ухо). Экстрагируемый растворимый антиген разрушенных, лизированных при гниении (или кипячении) бактерий термоустойчив. Поэтому преципитинogen готовят кипячением кусочков ткани в физиологическом растворе. Реакцию преципитации ставят в маленьких пробирках Уленгута или методом диффузии в агаровом геле (см. «Общая микробиология»).

Особое практическое значение реакция преципитации имеет при исследовании кожевенно-мехового сырья на сибирскую язву. Кусочки проб данного сырья доставляют в лабораторию в герметической упаковке. Пробы сразу обеззараживают автоклавированием, измельчают, экстра-

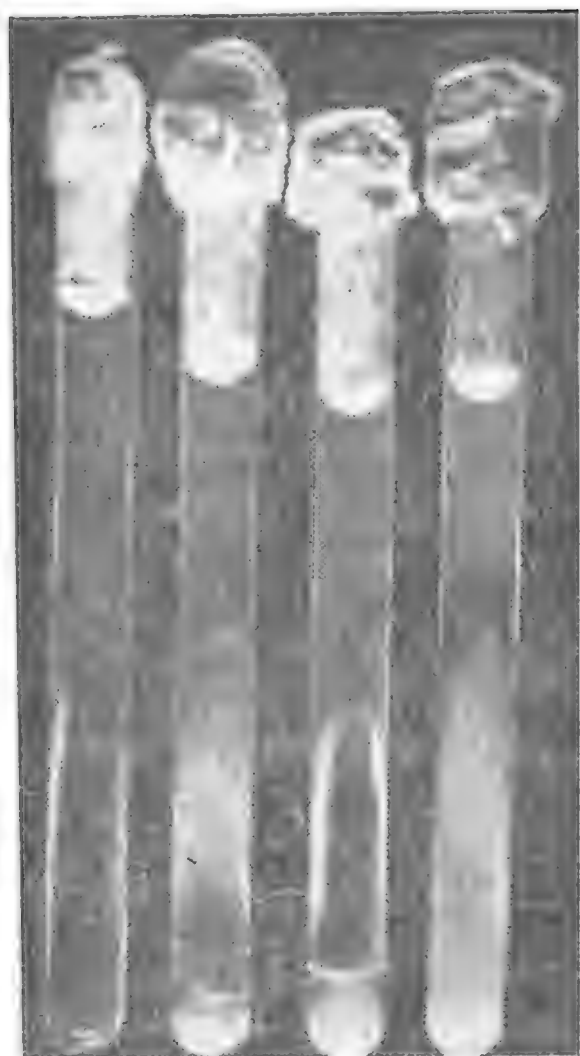


Рис. 75. Фаголизис сибирязвенной культуры на агаре в виде дорожки по ходу стекающей капли фага (пробирки 1-я и 3-я).



Рис. 76. *Bac. anthracis*. Феномен «ожерелья».

гируют «холодным способом» при 12—14° в физиологическом растворе (1 : 10) в течение 16—18 ч. Экстракт фильтруют через нейтральную асбестовую вату. Постановка реакции осуществляется, как указано выше. Из мокросоленого сырья предварительно (после автоклавирования) удаляют соль (диализ). Для этого полученные экстракты фильтруют, разливают в коллодийные мешочки и помещают на 45—60 мин в кристаллизатор с дистиллированной водой. После диализа мешочки переносят на 1 ч в кристаллизатор с 1%-ным раствором NaCl, а затем ставят реакцию, как обычно.

Вопросы для самопроверки. 1. Правила взятия патологического материала и бактериологическая диагностика сибирской язвы. 2. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *Bac. anthracis*. 3. Дифференцирование *Bac. anthracis* от сапрофитных грамположительных бацилл. 4. Фагодиагностика возбудителя сибирской язвы. 5. Серодиагностика сибирской язвы. 6. Феномен «ожерелья».

ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ

Патогенные анаэробы (за исключением возбудителя некробактериоза) относятся к порядку Eubacteriales, семейству Bacillaceae, роду Clostridium. Для получения культур анаэробов применяют специальные жидкие и плотные питательные среды: Китт — Тароцци, Вильсон — Блера, глюкозно-кровяной агар, молоко, желатину, среды с углеводами и индикатором, сывороточные среды, мартеновский бульон и агар.

Возбудители злокачественного отека — Clostridium perfringens, Cl. septicum, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum. Заболевание полимикробной этиологии, развивается вследствие инфицирования раневой поверхности микробами данной группы.

П а т о л о г и ч е с к и м м а т е р и а л о м для диагностики служит воспалительный экссудат и кусочки пораженной ткани из очага воспаления. Если материал нельзя быстро доставить в лабораторию, его консервируют в 40%-ном водном растворе глицерина или же полоски пораженной ткани в марлевом мешочке (от мух) высушивают на воздухе. Перед исследованием материал растирают в ступке с добавлением физраствора, а затем пастеровской пипеткой высевают его в среду Китт — Тароцци, Вильсон — Блера (рис. 77). Выросшие колонии на плотной среде пересевают в молоко, среды с углеводами. Из культуры в среде Китт — Тароцци пересевают на кровяной агар, с которого типичные колонии вновь пересевают в жидкую печеночную среду. Препараты-мазки готовят из исследуемого материала и колоний полученных культур, окрашивают по Граму. Для биопробы лучше использовать чистую культуру каждого выделенного возбудителя. Видовую принадлежность выделяемых выше названных микробов определяют в соответствии с характеристикой каждого из них.

Cl. perfringens (Cl. welchii) открыт Уелчем и Нетталем (1892). Крупная полиморфная палочка с закругленными концами, 4—8 мкм (рис. 78). Неподвижная, грамположительная. Во внешней среде находится в споровой форме. При культивировании споры образуются в средах, бедных углеводами и богатых белками, иногда в среду добавляют мел. В инфицированном организме образует капсулу. В жидких питательных средах вызывает равномерное помутнение бульона с обильным образованием газа, вследствие разложения углеводов. Затем микробная масса оседает

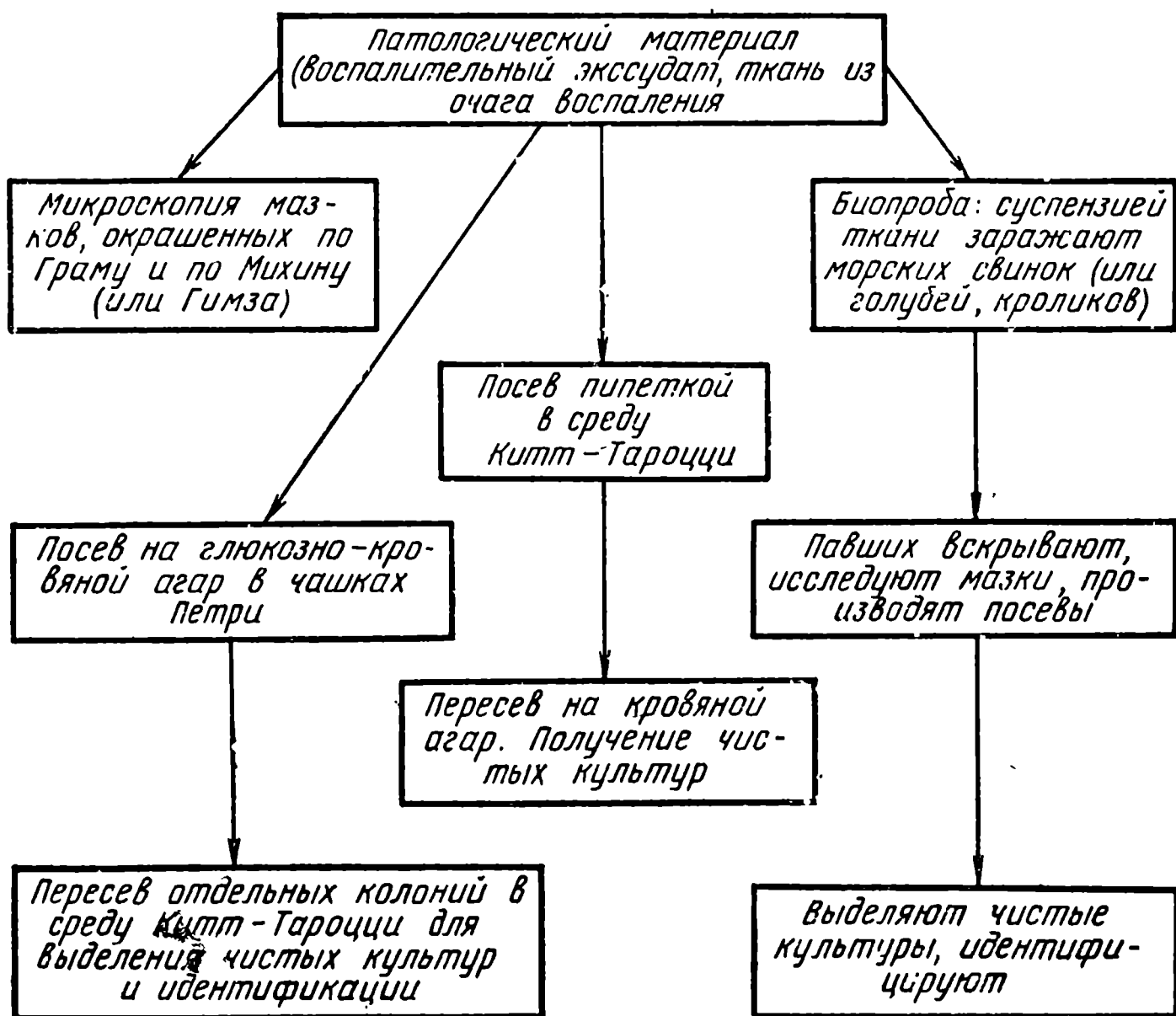


Рис. 77. Схема бактериологического исследования при злокачественном отеке.

на дно пробирки, среда просветляется. На кровяном агаре колонии круглые, выпуклые, сочные, с ровными краями зеленого (оливкового) цвета с обширной зоной гемолиза. На среде Вильсон — Блера (и на мозговой среде) черные колонии. Чистую культуру микроба засевают в молоко,

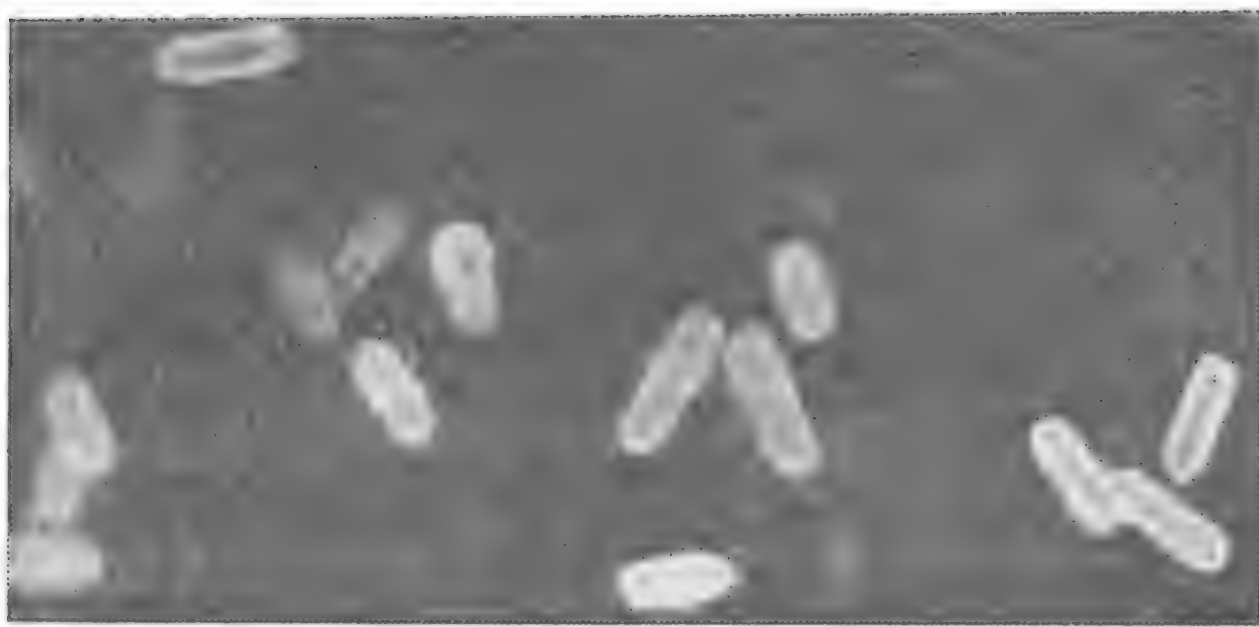


Рис. 78. *Cl. perfringens* в препарате-мазке, обработанном люминесцентной типоспецифической сывороткой.

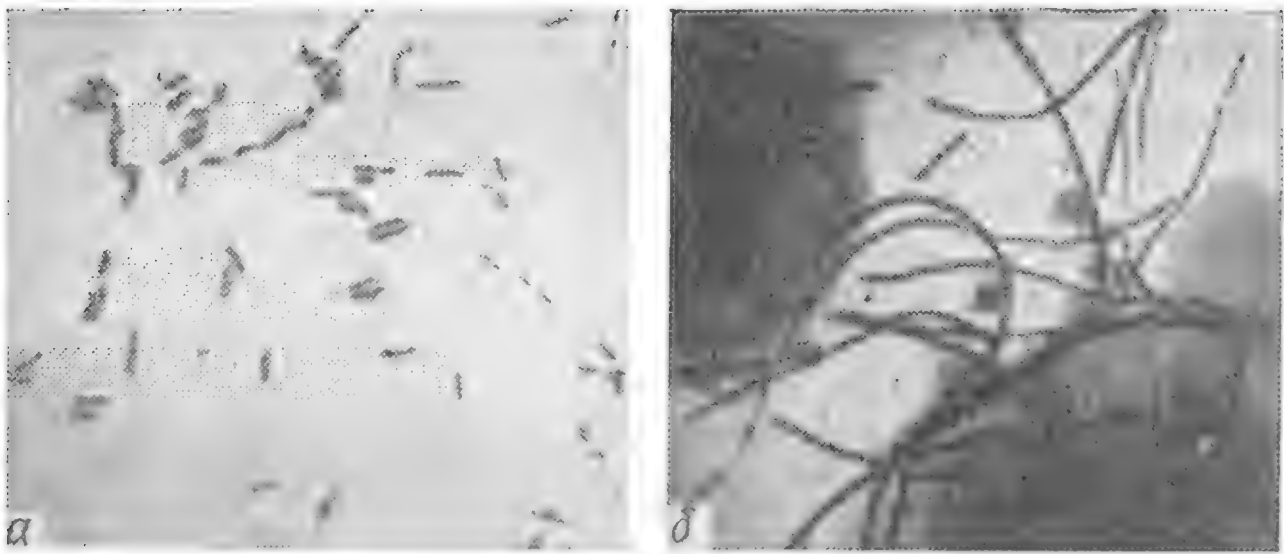


Рис. 79. *Cl. septicum*:

a — в препарате-мазке из культуры; *б* — в препарате из органов.

желатину (столбиком), среды с углеводами. Посевы помещают в микроанаэроостат и выдерживают 16—18 ч в термостате.

В молоке микроб образует губчатый (ноздреватый) сгусток казеина, обилие газа; желатину разжижает медленно; ферментирует с образованием кислоты и газа лактозу, сахарозу, мальтозу, крахмал. Для биопробы внутримышечно заражают морских свинок или голубей, кроликов, белых мышей. Животные погибают через 16—24 ч. Под влиянием бактериофага, лучей Рентгена, антибиотиков *Cl. perfringens* утрачивает патогенность.

Cl. perfringens продуцирует сложный токсин, обладающим летальным, некротизирующим и гемотоксическим действием. По антигенной структуре различают шесть типов токсинов — А, В, С, D, Е и F. Токсин типа А нейтрализуется типоспецифической антитоксической сывороткой; данный тип является участником ассоциации возбудителей злокачественного отека (и газовой гангрены). Тип В имеет второе название *Lamb-dysentery-Bacillus*; *L-D-Bacillus*. Его токсин нейтрализуется также типоспецифической сывороткой, но эта же сыворотка нейтрализует и токсин типа А. *L-D-Bacillus* вызывает дизентерию у ягнят в первые дни жизни. Токсин типа С нейтрализуется специфической антитоксической сывороткой. Является также возбудителем браздота овец. Токсин типа D (имеет второе название *Bac. ovitoxicus*) вызывает энтеротоксемию овец. Нейтрализуется антитоксином типа D. Тип Е может быть возбудителем инфекции у телят, а тип F — язвенного энтерита у овец.

При злокачественном отеке особенно часто выделяют *Cl. septicum* (*Vibrio septicum*) (рис. 79). Впервые этот микроб

был обнаружен в крови крупного рогатого скота Пастером и Жубером (1877). Этиологическую роль его при злокачественном отеке установил Кох (1881). Это полиморфная палочка величиной 3—8 мкм, в диаметре 0,6—0,8 мкм. Располагаются в виде длинных нитей как в инфицированном организме (особенно на серозных поверхностях внутренних органов), так и на питательных средах. Подвижная, перитрих. Окрашивается грамположительно. Образует центрально расположенную спору в организме и вне его. Оптимальная температура для микроба 37°, рН 7,6.

На среде Китт — Тароцци отмечают равномерное помутнение среды с обильным газообразованием. Затем бациллы оседают на дно пробирки и среда просветляется. На глюкозно-кровяном агаре появляется характерный рост в виде кружевного узорчатого сплетения с большой зоной гемолиза. Медленно разжижает желатину, выделяет сероводород, аммиак. Интенсивно ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, салицин. Медленно свертывает молоко. Продуцирует токсины, обладающие некротизирующим, летальным, гемотоксическим действием, и ферменты коллагеназу и гиалуронидазу. Нередко является возбудителем браззота овец. В лабораторных условиях для биологической пробы лучше использовать морских свинок, которые при внутрибрюшинном заражении погибают через 16—20 ч.

Cl. oedematiens (*Cl. Novyi*) открыт Нови (1894). Это крупная полиморфная палочка с закругленными концами, длиной 5—14 мкм. Располагается одиночно и в виде коротких цепочек. Подвижная, перитрих. Окрашивается грамположительно. Образует спору, расположенную субтерминально (рис. 80). Строгий анаэроб. Оптимальная температура роста 35—38°, рН 7,8. Хорошо растет в среде Китт — Тароцци (равномерное помутнение). На глюкозно-кровяном агаре образуются шероховатые колонии с неровными краями в виде бахромки, вокруг которых небольшая зона гемолиза. Медленно разжижает желатину, вызывая ее почернение. Молоко свертывает с образованием мелких хлопьев казеина. Ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, глицерин.

Cl. oedematiens продуцирует сильнодействующий экзотоксин. При введении лабораторным животным (кролику, морской свинке, голубю) на месте инъекции образуется студенистый экссудат (отек). В естественных условиях помимо злокачественного отека вызывает браззотоподобное

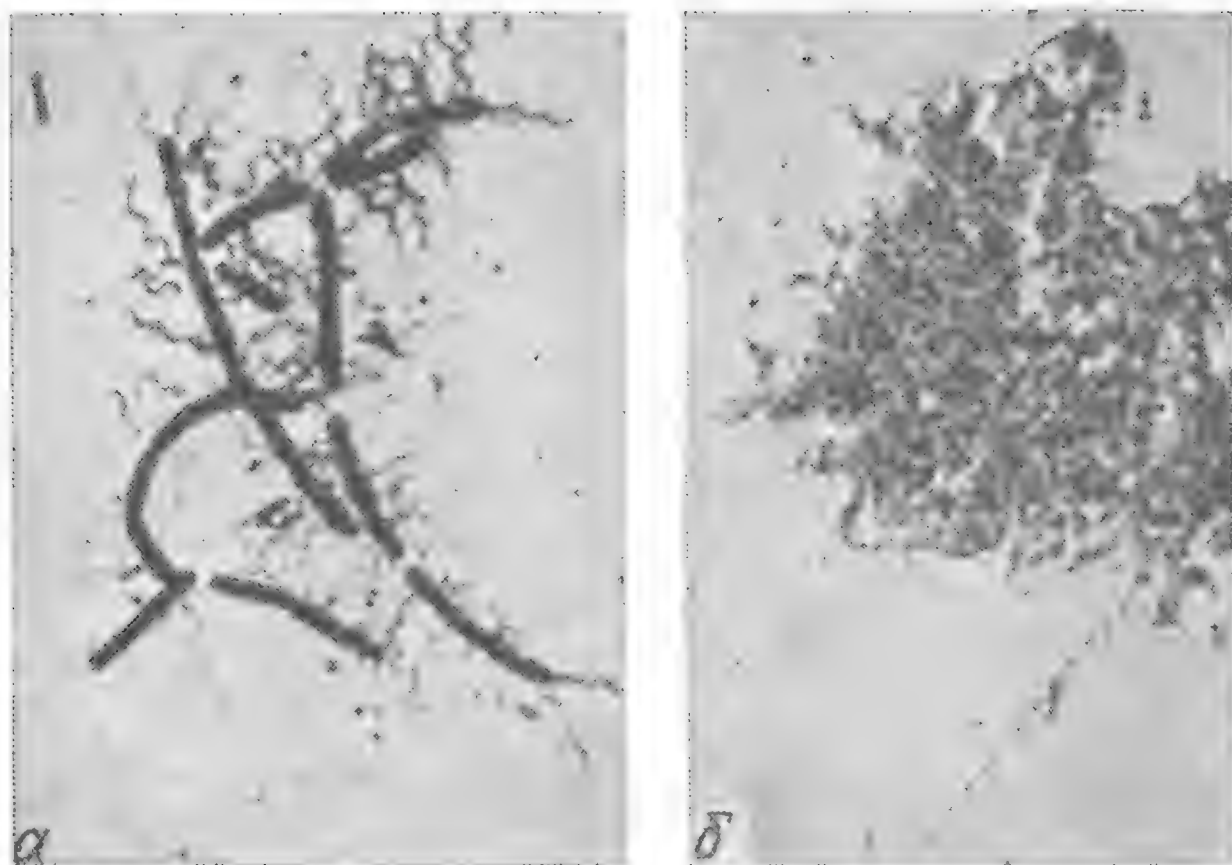


Рис. 80. *Cl. oedematiens*:

а — чистая культура ($\times 1000$); б — колонии на печеночном агаре.

заболевание с геморрагическими поражениями слизистой сычуга, кишечника, скоплением газа, некротическими поражениями печени.

Разновидности данного вида микроба могут быть причиной остеомиелита у буйволов.

Cl. histolyticum открыт в 1916 г. Палочковидный подвижный микроб, окрашивается грамположительно. Образует споры. Продуцирует протеолитический фермент, который обуславливает расплавление тканей инфицированного организма. Размер микробной клетки 2—5 мкм. На кровяном агаре растет в виде мелких росинчатых гладких колоний без зоны гемолиза. Молоко пептонизирует. Сахаролитическими свойствами не обладает — не ферментирует глюкозу, глицерин, сахарозу, мальтозу, салицин, инулин. Патогенен для всех лабораторных животных. На месте инъекции образуется язва.

Возбудитель дизентерии ягнят — *Cl. perfringens* тип В (L-D-Bacillus) вызывает остро протекающее заболевание у ягнят в первые дни после рождения. В лабораторию посылают кишечное содержимое. Порядок и методика исследования такие же, как при злокачественном отеке. Для установления типовой принадлежности ставят пробу нейтрализации токсина молодой культуры *Cl. perfringens* типовой антитоксической сывороткой.

Возбудители браззота овец — анаэробные клостридии: *Cl. perfringens* типа С, *Cl. septicum*, *Cl. oedematiens*. Браззот остро протекающее септическое заболевание овец, характеризующееся судорожными явлениями и высокой смертностью. Характеристика названных микробов изложена выше. Обнаружение указанных возбудителей служит основанием для диагноза. В лабораторию направляют кровь из сердца, слизистую сычуга, тонкого отдела кишечника, инфильтрат подкожной клетчатки, некротические очаги в печени. Порядок и методика исследования такие же, как при диагностике злокачественного отека и дизентерии ягнят. Выделенную чистую культуру идентифицируют по характерным морфологическим и культурально-биохимическим свойствам.

Возбудитель энтеротоксемии овец — браззотоподобного заболевания овец всех возрастов, с очень быстрым течением и смертельным исходом — *Cl. perfringens* типа D. В лабораторию отправляют содержимое кишечника и пораженную «размягченную» почку. Для биопробы заражают морских свинок, которые погибают в течение суток. Порядок проведения исследования тот же, что и при исследовании данной группы микробов.

При выявлении бацилл перфрингенс можно использовать метод флуоресцирующих антител.

Возбудитель эмфизематозного карбункула (эмкар) — *Cl. chauvoei*, впервые установлен в 1875—1876 гг. Вызывает инфекционное остро протекающее заболевание преимущественно у крупного рогатого скота, редко у овец и коз. Заражение происходит главным образом алиментарным путем. В местах, богатых мышечной тканью (бедро, подгрудок), образуется газовый отек (карбункул), опухолевидное образование, при надавливании слышен звук (шум, треск, крипитация) лопающихся пузырьков газа, образующихся при разложении ткани под влиянием ферментов бактерий.

Для бактериологического исследования направляют кусочки пораженной мышечной ткани из карбункула, нарезанные в виде полосок. Эти кусочки мышц, если нельзя их быстро доставить в свежем виде, консервируют в 40%-ном водном растворе глицерина, высушивают на воздухе, завернутыми в марлю или обрабатывают раствором NaCl. В лаборатории свежий присланный материал растирают в стерильной ступке с дробленным стеклом или кварцевым песком, а консервированный в глице-

рине предварительно отмывают стерильным физиологическим раствором, потом растирают.

Бактериологическое исследование включает: микроскопирование, посев на питательные среды, выделение чистой культуры и биопробу.

М и к р о с к о п и р о в а н и е. *Cl. chauvovae* —

толстая крупная грамположительная спорообразующая палочка, перитрих. Споры располагаются центрально, терминально и субтерминально. Диаметр споры превышает диаметр вегетативной клетки.

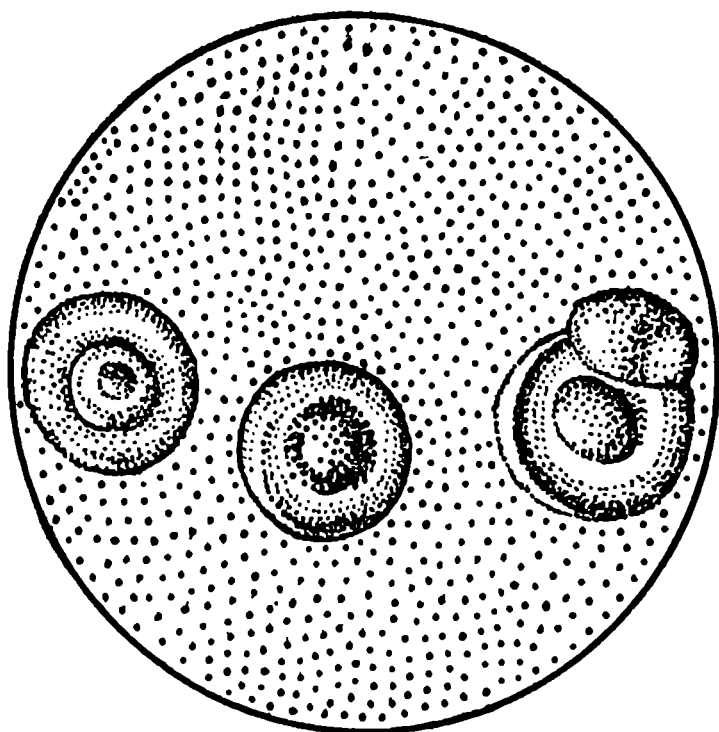


Рис. 81. Колонии *Cl. chauvovae*.

К у л ь т у р а л ь н о - б и о х и м и ч е с к и е с в о й с т в а. Оптимальная температура роста 36—38°. Рост в жидких средах проявляется в виде равномерного помутнения с газообразованием, затем микробная масса оседает на дно, среда просветляется. Желатину разжижает. В глубине сывороточного агара чечевицеобразные колонии. Молоко свертывает, образуя мелкие хлопья казеина. На глюкозно-кровяном агаре образует колонии, имеющие сходство с виноградным листом или в виде перламутровой пуговицы (рис. 81). Интенсивно ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу.

П а т о г е н н о с т ь проверяют чаще внутримышечным (с внутренней стороны бедра) заражением морских свинок, гибель которых наступает через 24—96 ч после заражения. Перед заражением животным вводят 1—2%-ный раствор молочной кислоты или исследуемый растертый материал инъецируют вместе с кварцевым песком или дробленым стеклом. Молочная кислота, песок, стекло вызывают некроз ткани, что способствует более быстрому проникновению в ткани микроба и размножению его в организме.

Cl. chauvovae продуцирует термолабильный экзотоксин на мартеновском бульоне. Другим фактором вирулентности данного микроба является способность продуцировать агрессивины (в организме и на питательных средах). Агрессивины можно получить при фильтрации воспалительного экссудата или старой бульонной культуры.

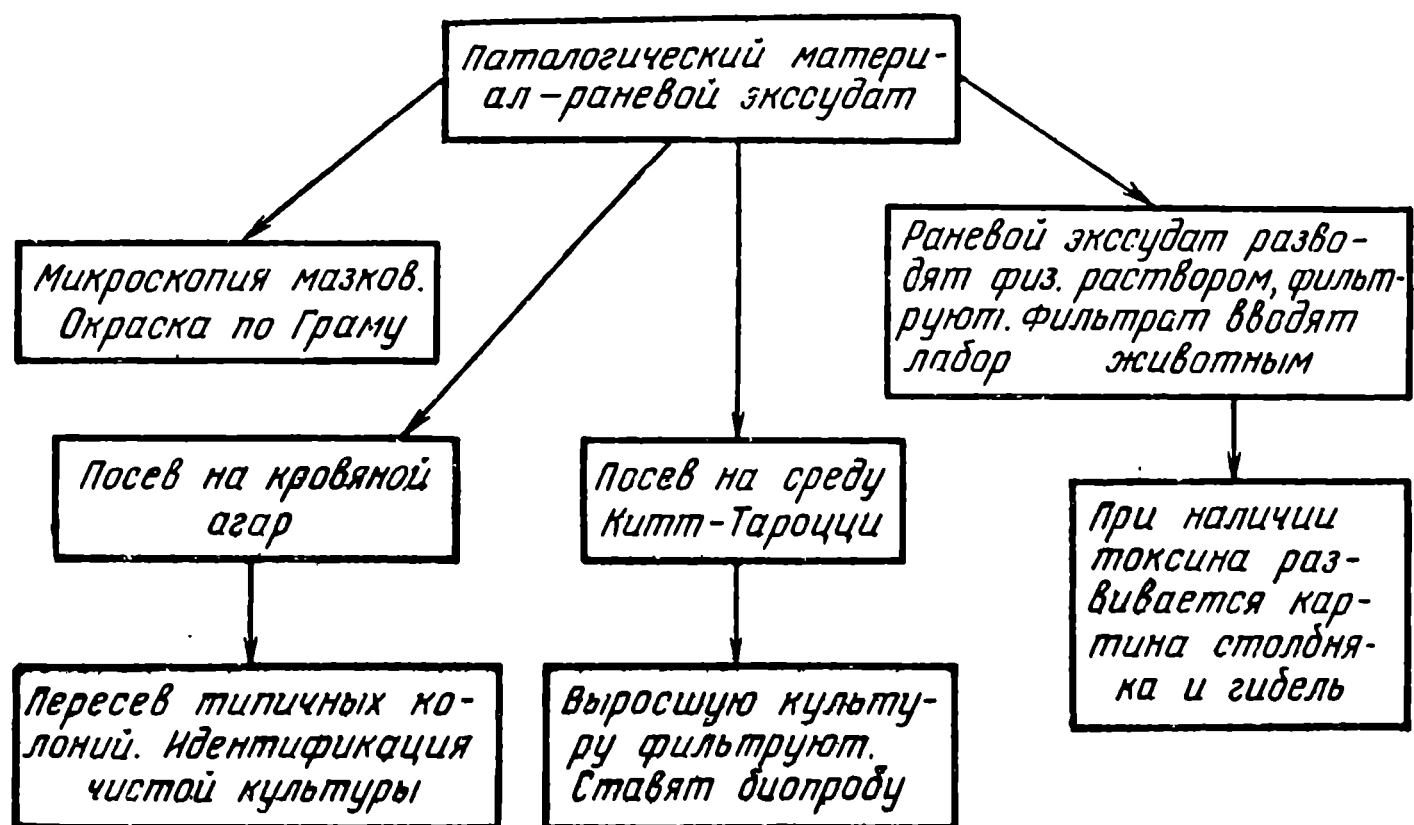


Рис. 82. Схема микробиологической диагностики столбняка.

Возбудитель столбняка — *Cl. tetani* открыт Николайе-ром (1884). Чистую культуру впервые выделил Китазато (1889). Инфицирование происходит, как правило, при ранениях.

Если клинические признаки столбняка типичные, то необходимости в микробиологическом исследовании пат-материала нет. В сомнительных случаях в лабораторию направляют раневой экссудат. Основное в диагностике столбняка — обнаружение специфического токсина. Раневой воспалительный экссудат засевают пастеровской пипет-кой в среду Китт — Тароцци, посеы инкубируют в тер-мостате 5—7 дней. Полученную культуру фильтруют через асбестовые фильтровальные пластинки Зейтца. Фильтрат вводят подкожно белым мышам или морским свинкам, пос-ледние гибнут с выраженной клинической картиной столб-няка. Параллельно исследуемый материал микроскопиру-ют, высевают на глюкозно-кровяной агар. При исследова-нии проб почвы взвесь пробы прогревают при 80° 30 мин, затем засевают в среду Китт — Тароцци, культивируют в термостате, далее культуру фильтруют и ставят биопробу (рис. 82).

Cl. tetani — тонкая грамположительная палочка дли-ной 4—8 мкм, анаэроб, подвижная (перитрих), образует концевую спору (терминально). Споры сферической формы, их диаметр значительно превышает диаметр вегетативной клетки, вследствие чего микроб приобретает вид «барабан-

ной» палочки (рис. 83). Оптимальная температура 37°, рН 7,4—7,9. В среде Китт — Тароцци (и других жидких средах) растет, вызывая равномерное помутнение среды с последующим оседанием клеток на дно пробирки и просветлением бульона (через 3—4 дня). Висмут-сульфит-агар и мозговая среда чернеют. На глюкозно-кровяном агаре растет в виде небольших колоний с неровными краями. Зона гемолиза проявляется не у всех штаммов. В процессе роста на питательных средах происходит ферментация белковых веществ с образованием газообразных продуктов, имеющих неприятный запах. Медленно разжижает желатину. Углеводы почти не ферментирует.

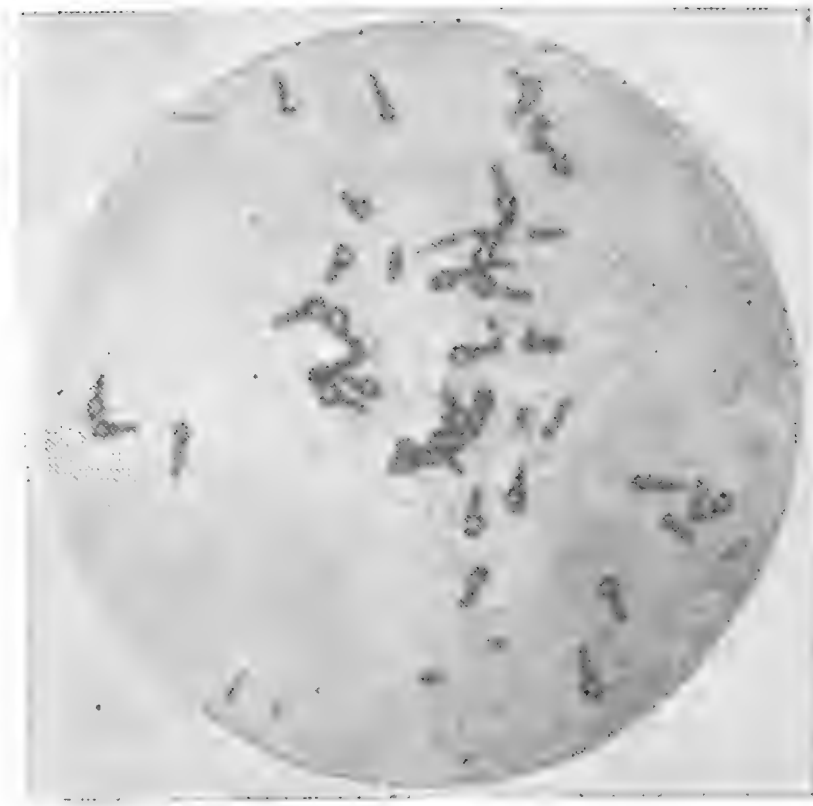


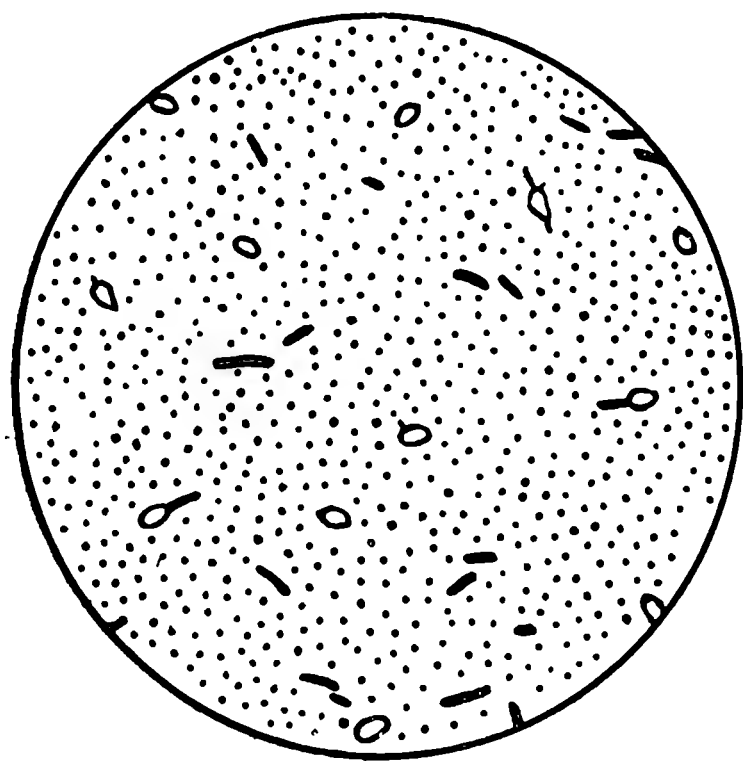
Рис. 83. *Cl. tetani* в культуре (×1000).

Cl. tetani продуцирует сильный экзотоксин, чем и обуславливает патогенное действие. Токсин включает две фракции — тетаноспазмин, вызывающий поражение нервной ткани, судорожное сокращение мышц, и тетанолизин — лизирующий эритроциты. Из лабораторных животных для биопробы используют морскую свинку или белую мышь, кролика, белых крыс. В естественных условиях к токсину чувствительны все виды животных и человек.

Возбудитель ботулизма — *Cl. botulinum*, открыт Ван-Эрменгемом (1896), который выделил его из колбасы, вызвавшей отравление у людей (*botulus* — колбаса). Ботулизм — кормовая (пищевая) токсикоинфекция, проявляющаяся параличом глотки, гортани и конечностей. Смертность — 100%.

Морфологически *Cl. botulinum* — крупная подвижная грамположительная палочка. Образует расположенную терминально спору, расширяющуюся к наружному концу в виде теннисной ракетки (рис. 84). Строгий анаэроб. На среде Китт — Тароцци растет в виде равномерного помутнения среды с последующим ее просветлением и осаждением микробной массы на дне пробирки. На кровя-

ном агаре рост колоний с отростками и зоной гемолиза. Восприимчивы все виды животных и человек. Действие на организм оказывает продуцируемый экзотоксин очень сильного влияния. По антигенной структуре различают несколько типов токсинов: А, В, С, D, Е. Каждый из них нейтрализуется типоспецифической антитоксической сывороткой. *Cl. botulinum* типов А и В обладает протеолитическими свойствами, разжижает желатину, продуцирует сероводород, аммиак, масляную кислоту. Молоко пептонизирует с образованием газа. Ферментирует глюкозу, глицерин, мальтозу.



а

Ботулизм у человека обычно вызывают типы А, В, Е, у лошадей чаще тип В, реже тип С, у крупного рогатого скота — тип D и С, у овец и птиц — тип С. Для лабораторного анализа направляют остатки корма, вызвавшего от-

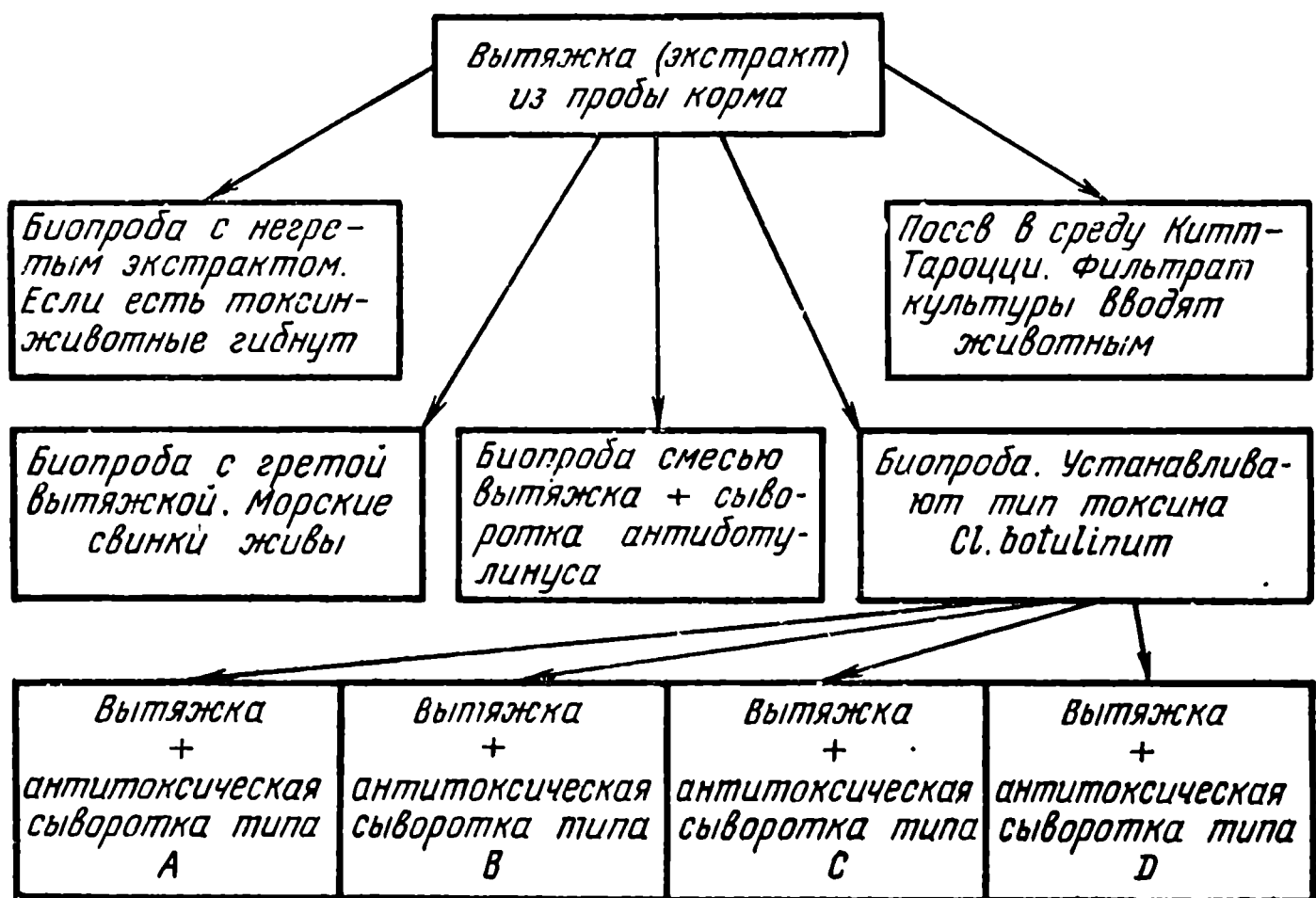
Ботулизм у человека обычно вызывают типы А, В, Е, у лошадей чаще тип В, реже тип С, у крупного рогатого скота — тип D и С, у овец и птиц — тип С. Для лабораторного анализа направляют остатки корма, вызвавшего от-



б

Рис. 84. *Cl. botulinum*:

а — препарат-мазок из культуры; б — в препарате под люминесцентным микроскопом.



Учет результата: тип токсина в фильтрате нейтрализуется гомологичной сывороткой-свинки живы. Остальные гибнут

Рис. 85. Схема лабораторного исследования кормов для диагностики ботулизма (токсина ботулинуса).

равление (у крупных животных), рвотные массы (у собак, кошек). После гибели животного исследуют содержимое желудка, кишечника, лимфоузлы, головной мозг, селезенку. Чтобы избежать инактивации токсина, каждый вид материала помещают в отдельную банку темного стекла (или обертывают банку черной бумагой), герметично закрывают. Поступивший материал в лабораторию исследуют бактериологически с целью выделения культуры и обнаружения токсина возбудителя (рис. 85).

Для выделения культуры производят посевы на жидкие и плотные питательные среды. Помимо этого, каждую пробу материала заливают физиологическим раствором NaCl 1 : 2 для экстрагирования токсина. Через 1—2 ч полученный экстракт фильтруют через пластинки Зейтца. Фильтрат делят на три порции: одну вводят лабораторным животным (при наличии токсина животные гибнут); вторую порцию прогревают при 80° 30 мин, инъецируют морским свинкам — животные должны остаться живыми (токсин термолабильный); третью порцию смешивают с поливалентной антитоксической антиботулинической сывороткой и выдерживают в термостате 1—2 ч, затем смесь вводят подкожно морским свинкам. Токсин ботулинуса нейтрализуется специфичес-

кими антителами сыворотки (антитоксинами) и при инъекции животным гибели не вызывает.

Если необходимо установить тип токсина, фильтрат разливают в пробирки по 1 мл и в каждую пробирку добавляют антисыворотку разного типа. После контактирования в течение 1—2 ч смесь токсин(фильтрат)-антитоксин(сыворотка) из каждой пробирки вводят отдельным группам животных. Не погибают только те животные, которым была введена смесь с нейтрализованным токсином (антисывороткой определенного типа).

Возбудитель некробактериоза — *Fusobacterium necrophorum*, (*Sph. filiformis*, *Bact. necrosis*) впервые описан Леффлером (1884). Как возбудитель некробактериоза (копытной болезни) северных оленей описан Ревнивых (1932). *Fus. necrophorum* относится к семейству *Bacteriodaceae*, роду *Fusobacterium*. Палочка некроза обычно вызывает местный некротический процесс, чаще поражаются ткани в области конечностей, но может быть и генерализованный процесс с образованием метастазов в виде некротических очагов в печени, легких, почках и др. У северных оленей болезнь часто приводит к летальному исходу.

Для бактериологической диагностики и используют пораженную ткань, взятую на границе некротизированной и здоровой ткани. Поскольку из данного материала чистую культуру получить трудно (бактерия некроза всегда находится в ассоциации с другими микробами), исследуют пораженные очаги внутренних органов. С этой целью некротизированную ткань растирают в ступке с небольшим количеством физраствора, полученной взвесью патологического материала заражают кролика. После гибели последнего труп вскрывают и из очагов поражения производят посевы на питательные среды для культивирования анаэробов и готовят бактериоскопические препараты. *Fus. necrophorum* — сравнительно тонкая, неподвижная, грамотрицательная палочка, анаэроб, споры и капсулы не образует. В пораженной ткани (в препаратах-отпечатках) и в культуре располагается длинными нитевидными цепочками. Окрашивается неравномерно, отмечается зернистость цитоплазмы.

Культурально-биохимические свойства. Оптимальная температура роста 34—37°. В среде Китт — Тароцци отмечают равномерное помутнение, газообразование. В сывороточном агаре столбиком через 3—4 дня появляются чечевицеобразные колонии с нитевидными

ответвлениями. На глюкозно-кровяном агаре — мелкие колонии. Не разжижает желатину, не образует сероводорода и индола. Разлагает сахарозу, салицин.

Для биопробы используют кролика (заражают аппликацией патологического материала в подкожный отпрепарированный «кармашек» или инъецируют подкожно сбоку), белых мышей. Кролики гибнут через 1—2 мес., мыши — через 8—14 дней. Для диагностики атипичных форм некробактериоза была разработана РСК (Коляков, Захаров, 1945) с антигеном — экстрактом трехдневной культуры *Fus. necrophorum* в печеночном бульоне. Титр антигена 1 : 40.

Обнаружить бактерии некроза можно и методом флуоресцирующих антител.

Вопросы для самопроверки. 1. Питательные среды и условия культивирования анаэробов. 2. Возбудители злокачественного отека, их культурально-морфологические, тинкториальные особенности. 3. Патологический материал и его исследование для диагностики злокачественного отека. 4. Возбудители дизентерии ягнят, браззота и энтеротоксемии овец, их бактериологическая диагностика. 5. Возбудитель эмкара, патологический материал порядок исследования. 6. Возбудитель столбняка и его бактериологическая диагностика. 7. Материал и особенности исследования при диагностике ботулизма. 8. Материал и бактериологическая диагностика некробактериоза.

ПАТОГЕННЫЕ МИКОБАКТЕРИИ

Возбудитель туберкулеза открыт Кохом (1882), относится к порядку *Actinomycetales*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*. Наибольшее значение в патологии сельскохозяйственных животных и человека имеют следующие виды микобактерий: *M. tuberculosis* — возбудитель туберкулеза человека, *M. bovis* — возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота, *M. avium* — возбудитель туберкулеза птиц. Туберкулез характеризуется образованием в различных тканях и органах специфических очагов — бугорков (туберкул), по мере развития процесса подвергающихся творожистому перерождению. При разных формах течения туберкулеза отмечают повышение температуры, увеличение лимфатических узлов, прогрессирующее истощение организма, а при поражении органов дыхания — кашель.

Бактериологический диагноз основан на микроскопии препаратов из патологического материала, выделении чистой культуры возбудителя туберкулеза и заражении лабораторных животных. Исходя из того что

туберкулез преимущественно протекает в скрытой форме (латентно), для своевременного выявления больных применяют аллергический метод диагностики — туберкулинизацию при помощи аллергена туберкулина.

Для бактериологического анализа направляют: при жизни животного — истечения из носа, бронхиальную слизь, молоко (особенно при увеличении надвыменных лимфоузлов) не менее 100 мл, фекалий (30—50,0), реже мочу (200 мл); посмертно или после убоя — пораженные части органов и лимфоузлы (бронхиальные, заглоточные, средостенные, предлопаточные, надвыменные).

При взятии патологического материала необходимо соблюдать правила асептики и личной профилактики, технику безопасности. Материал в лабораторию лучше доставлять свежим. Если нет такой возможности, то лимфоузлы, кусочки органов консервируют в 30—40%-ном водном растворе глицерина. Обсемененность исследуемого материала бактериями туберкулеза может быть незначительной. Поэтому, чтобы повысить концентрацию возбудителя в пробах (для большей достоверности результатов исследования), применяют специальные методы обработки и обогащения.

Бронхиальную слизь (мокроту) собирают в пробирки с 6%-ным раствором серной кислоты, закрывают резиновой пробкой, встряхиванием промывают 5—6 мин, центрифугируют, кислоту отсасывают, к осадку добавляют физраствор, вновь встряхивают, центрифугируют. Так промывают 2—3 раза. Промытый осадок высевают на питательные среды и готовят мазки.

Молоко центрифугируют. Осадок обрабатывают также раствором серной кислоты, промывают физраствором, центрифугируют. Из осадка готовят препараты-мазки и производят посев на питательные среды.

Масло (2—4 г) вносят в стерильную пробирку, заливают горячей водой, закрывают резиновой пробкой, встряхивают 5—10 мин, перевертывают пробирку вверх дном, ставят в штатив и оставляют в прохладном месте. Когда масло застынет, осторожно приоткрывают пробку, жидкость выливают в центрифужные пробирки, а далее исследуют, как молоко.

Пораженные ткани нарезают мелкими кусочками и растирают в стерильной ступке с 6%-ной серной кислотой в соотношении 1 : 4, фильтруют через марлю, центрифугируют и из осадка готовят мазки и производят посевы на питательные среды.

Фекалии (50,0) растирают в стерильной ступке с 18%-ным раствором серной кислоты, фильтруют через марлю, центрифугируют, исследуют осадок, как в предыдущих случаях.

Содержимое туберкул («узелков») дополнительно исследуют микроскопированием препаратов, приготовленных растиранием: кусочки творожистой массы очажка растирают между двумя предметными стеклами.

Возбудитель туберкулеза относится к группе кислото-спирто-щелочеустойчивых бактерий, что обусловлено наличием стеариновых кислот (миколовой, фтионовой) и других воскоподобных веществ на поверхности клетки (в ее оболочке). Наличие этих веществ придает микробной клетке гидрофобность, то есть способность отталкивать воду и водные растворы красителей, кислот, щелочей. В связи с этим бактерии туберкулеза трудно воспринимают окраску. Для окрашивания этой группы бактерий применяют специальные методы окраски, среди которых наиболее распространенным является метод Циль — Нильсена. По этому методу микобактерии окрашиваются в розово-красный цвет. Грамположительны. Для микроскопического исследования патологического материала рекомендован также люминесцентный метод.

Возбудитель туберкулеза палочковидной формы микроб, длиной 1,5—5 мкм, в диаметре — 0,5 мкм. *M. tuberculosis* — тонкая, слегка изогнутая палочка, *M. bovis* — короткая и толстая, *M. avium* — мельче остальных видов, обладает полиморфизмом. Микобактерии туберкулеза неподвижные, не образуют капсулу и спору. В мазках из исследуемого материала располагается одиночно и небольшими скоплениями. В мазках из культур, помимо одиночных бактерий, встречаются длинные нити с разветвлениями. Часто встречается неравномерность в окрашивании, наличие в цитоплазме зернистости (грамположительные некислотоустойчивые «зерна Муха»). Микобактерии аэробы. Растут только на специальных средах с добавлением глицерина.

Для выделения чистой культуры из патологического материала используют элективные (избирательные) среды — яично-крахмальные, картофельные с глицерином и краской для задержки роста посторонних микроорганизмов.

Среда Петраньяни — к 150 мл молока добавляют 6,0 картофельного крахмала, 1,0 пептона, одну картофелину (величиной с яйцо), порезанную на мелкие кусочки, нагревают 10 мин в водяной бане при помешивании, затем остав-

ляют на 1 ч в бане, продолжая помешивать, охлаждают до 50°, добавляют четыре яйца целиком и один желток, 12 мл глицерина, 10 мл 2%-ного водного раствора малахитовой зелени. Тщательно перемешивают, фильтруют через марлю, разливают по пробиркам и в наклонном положении нагревают в аппарате Коха для свертывания массы: 1-й день при 80° — 20 мин, 2-й и 3-й дни — по 15 мин при 75°. Замена пептона аспарагином повышает ценность среды.

Среда Петрова: к 250,0 фарша свежей телятины добавляют 212 мл воды, 37—38 мл стерильного глицерина, фильтруют через стерильную марлю. Отдельно взбивают яйца, фильтруют через марлю. К 200 мл ранее приготовленного бульона из телятины добавляют 400 мл яичной массы, лучше к яичной массе доливать воды, 1 мл 1%-ного спиртового раствора генцианвиолета из расчета на 100 мл среды, все хорошо размешивают, разливают в пробирки и стерилизуют в наклонном положении: 1-й день — при 85° 30 мин, 2-й и 3-й дни — при 75° 30 мин. На равномерно окрашенном фоне фиолетовой среды отчетливо видны белые и желтоватые колонии бактерий туберкулеза.

Для культивирования используют также синтетические среды, например, Дорсе и Моделя. *Среда Дорсе* представляет собой тщательно растертое яйцо с 10 мл раствора Рингера, затем эту смесь взбалтывают в сосуде с бусами и разливают по пробиркам, стерилизуют дробно — 3 дня при 75° по 1 ч. *Среда Моделя:* двуосновной фосфорнокислый калий — 5,0, лимоннокислый аммоний — 10,0, сернокислый магний — 0,5, сернокислое железо — 0,05, глицерин — 50 мл, дистиллированная вода — 1 л, рН 7,2. Стерилизуют при 115° 20 мин.

Культивировать можно и на обычном картофеле, пропитанном 3—4%-ным глицерином, на глицериновом МПБ и глицериновом МПА. Инкубируют при 37° от 3—4 недель до 2—3 мес. Рост учитывают каждые 5—7 дней. Отдельные виды микобактерий могут проявить рост через 2—4 недели.

К у л ь т у р а л ь н ы е с в о й с т в а. Рост *M. tuberculosis* в глицериновом бульоне проявляется на поверхности среды в виде толстой складчатой пленки с широким пристеночным кольцом (рис. 86). На плотных средах рост обильный, колонии сухие бородавчатые или сморщенные, иногда в виде узелков, цвет слоновой кости (на среде Петраньяни колонии серовато-желтоватые). У *M. bovis* на среде Петраньяни колонии зеленоватые, на бульоне образует пленку нежную, иногда сетчатую, не покрывающую всей

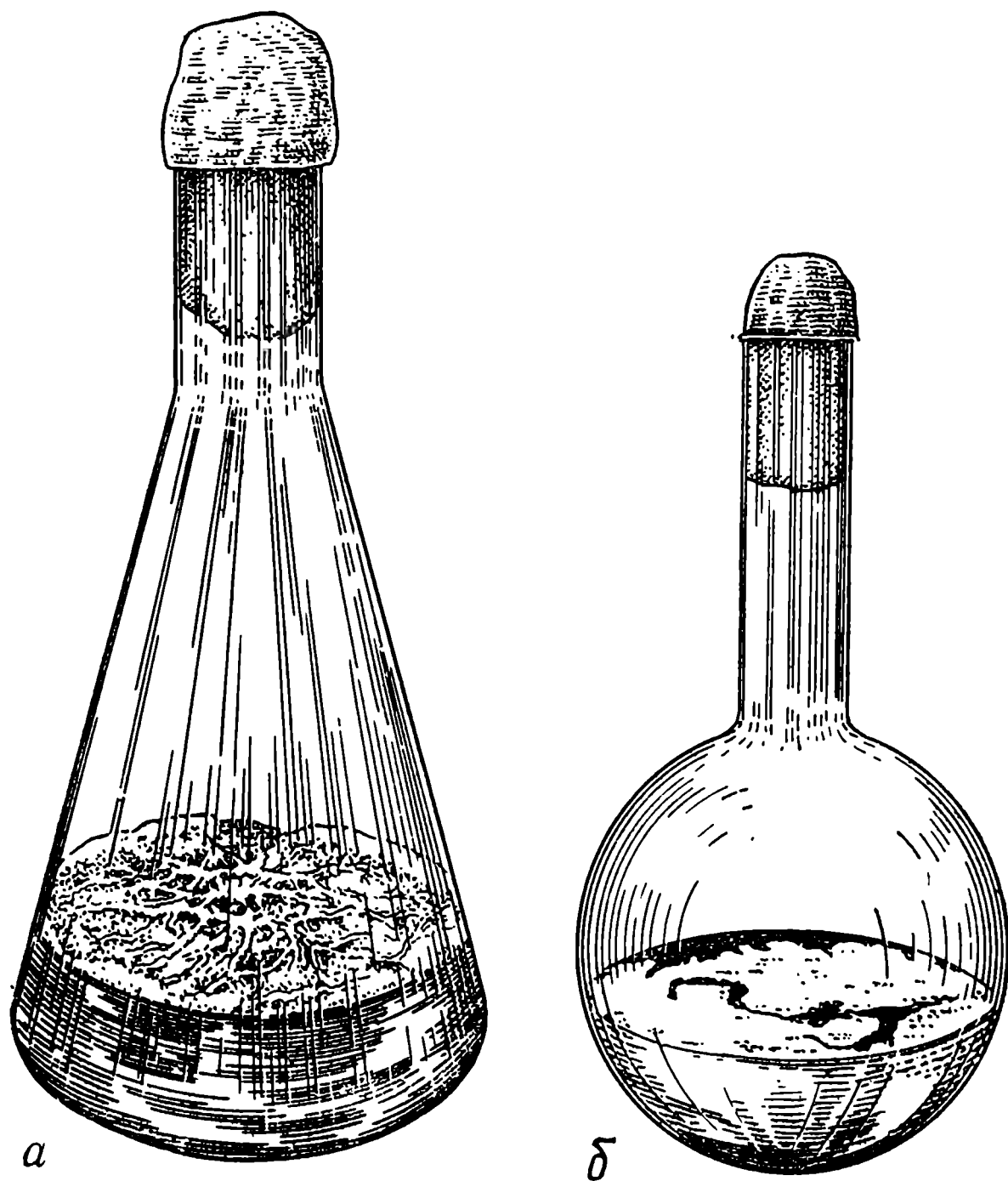


Рис. 86. Рост *Mycobacterium tuberculosis* (а) и *M. bovis* (б) в глицериновом бульоне.

поверхности среды. На плотных средах рост скудный, колонии сухие, мелкие, зернистые, серовато-белого цвета. *M. avium* в жидких средах образует сначала сухую, затем ослизняющую пленку по всей поверхности среды. На плотных средах влажный и слизистый налет. Колонии серовато-белые или желтоватого цвета, по форме могут напоминать пуговицеобразное круглое возвышение, иногда кратерообразное углубление. На среде Петраньяни колонии золотистые. Растет быстрее, чем остальные виды микобактерий.

При исследовании масла и других подобных материалов следует учитывать возможность наличия кислотоустойчивых сапрофитов (*M. phlei* и др.), которые растут на питательных средах очень быстро по сравнению с патогенными микобактериями (4—7 дней).

Выделив чистую культуру микобактерий, определяют ее видовую принадлежность. Одним из распространенных методов дифференциации является культивирование в гли-

цериновом бульоне с 5% желчи. Каждый вид микобактерий растет в присутствии желчи соответствующего вида животного: *M. avium* — в присутствии только птичей желчи, *M. bovis* — с добавлением желчи крупного рогатого скота. Наличие миколовой кислоты в клетках способствует тому, что патогенные штаммы растут на питательных средах в виде косичек, хорд («корд-фактор»). Биопробу используют для установления патогенности и дифференциации видов бактерий туберкулеза. Заражают морских свинок, кроликов и при необходимости кур, предварительно проверенных аллергическим методом для исключения спонтанного туберкулеза. Для заражения применяют либо выделенную культуру, либо присланный в лабораторию материал. Последний предварительно обрабатывают по Гону серной кислотой, как указывалось выше, растирая в стерильной ступке. Затем к осадку после центрифугирования добавляют 15%-ный раствор двууглекислой соды, оставляют на 10—15 мин и вновь центрифугируют 5 мин. Образовавшийся осадок дважды промывают стерильным физиологическим раствором NaCl с последующим центрифугированием, а затем осадок вновь эмульгируют в физрастворе, отстаивают 5—10 мин. Надосадочную жидкость вводят по 1—2 мл морским свинкам в паховую область и кроликам внутривенно.

У морских свинок в положительных случаях через 2—3 недели на месте введения образуется уплотнение, затем язва с одновременным увеличением регионарных лимфоузлов. Этим свинкам через 2—3 недели подкожно вводят туберкулин, что приводит к бурной генерализации процесса и гибели животных. При вскрытии из типичных туберкулов готовят мазки и делают посевы. *M. bovis* вызывает генерализованный процесс туберкулеза у кроликов и морских свинок. *M. tuberculosis* патогенны лишь для морских свинок, вызывая заболевание в период от трех недель до трех месяцев после заражения. *M. avium*, как правило, обуславливает у кроликов септический процесс без образования специфических бугорков и приводит к быстрой гибели животных (особенно при внутривенном заражении).

Для дифференциации отдельных видов микобактерий лучше заражать животных суспензией выращенных культур. Если у выделенных культур слабая вирулентность и атипичный рост, то микобактерии необходимо дифференцировать от кислотоустойчивых сапрофитов. Для этого используют следующие тесты. 1. *Определение каталазной активности*. В пробирку с выросшей культурой на

яичной среде вносят 50%-ный раствор пергидроля, чтобы вся поверхность среды с культурой была покрыта. С момента появления пузырьков газа учитывают результат — столбик пены измеряют в мм. Хотя каталазной активностью обладают все кислотоустойчивые бактерии, у сапрофитов она выражена интенсивнее.

2. *Определение фармамидазной активности.* Суспензию культуры с поверхности яичной среды обрабатывают растворами — сначала формамидом, затем последовательно сернокислым марганцем, феноловым реактивом и гипохлоридом кальция (согласно имеющемуся наставлению по данной методике). Появление синего кольца указывает на положительную фармамидазную активность, присущую только кислотоустойчивым сапрофитам.

3. *Определение лекарственной устойчивости* осуществляют с культурами, выращенными на питательных средах с добавлением различных концентраций туберкулостатических препаратов (стрептомицин, ПАСК и др.). Вирулентные штаммы *M. tuberculosis*, *M. bovis*, как правило, чувствительны к действию этих препаратов. Между тем атипичные штаммы, кислотоустойчивые сапрофиты и *M. avium* обладают устойчивостью в отношении антитуберкулезных лечебных препаратов, особенно к фтивазиду и ПАСК (параминосалициловая кислота).

А л л е р г и ч е с к и й м е т о д (туберкулинизацию) осуществляют в хозяйстве как метод массовой диагностики скрытых форм туберкулезного процесса. С этой целью применяют специфические препараты — туберкулин для крупного рогатого скота и отдельно для птиц.

Возбудитель паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота — *Micobacterium paratuberculosis*, вызывает заболевание преимущественно у крупного рогатого скота, реже у овец, верблюдов и очень редко у коз и оленей. Впервые возбудитель описан Ионе и Фротингемом (1895). Паратуберкулез — хроническое инфекционное заболевание, характеризующееся образованием отечно-воспалительных складок слизистого и подслизистого слоя пораженного участка кишечной стенки под действием локализованного здесь возбудителя. Характерные клинические признаки болезни — профузный понос и прогрессирующее истощение.

Для лабораторной диагностики при жизни животного посылают фекалии с комочками слизи и примесью крови, соскобы со слизистой оболочки прямой

кишки; посмертно (или при убое) исследуют пораженные участки кишечника, отрезок подвздошной кишки, перевязанный с двух сторон, мезентериальные лимфатические узлы. Материал берут с соблюдением правил асептики, консервируют в 30%-ном растворе глицерина (для гистологического исследования консервируют в 10%-ном растворе формалина).

Б а к т е р и о л о г и ч е с к и й а н а л и з включает микроскопию мазков из патологического материала и выделение чистой культуры возбудителя паратуберкулеза. Основным ориентиром является результат микроскопирования препаратов, так как выделение чистой культуры возбудителя сопряжено с большими трудностями. Биологическую пробу на паратуберкулез не ставят (лабораторные животные не восприимчивы).

Подготовка материала. Учитывая загрязненность материала посторонней микрофлорой, его предварительно обрабатывают с целью очистки и концентрации возбудителя, как и при диагностике туберкулеза, а также применяют способы Венота и Моро или метод флотации.

Метод Венота и Моро: 2—4,0 фекалий растирают в стерильной ступке, добавляют 25%-ный раствор NaCl до получения жидкой консистенции и фильтруют через двойной слой марли, сливают в центрифужные пробирки, добавляют по 1 мл петролейного эфира (можно бензина или лигроина), взбалтывают, центрифугируют 15—20 мин при 3000 об/мин. Мазки готовят из нижней части надосадочного слоя жидкости.

Метод флотации. Фекалии разводят дистиллированной водой, фильтруют через марлю и 16 мл фильтрата вносят в пробирку емкостью 20 мл и диаметром 1,5 см, добавляют 2 мл эфира, плотно закрывают пробкой, встряхивают в течение 1 мин. Затем пробирку оставляют на несколько минут в штативе и открывают пробку для испарения эфира. Мазки готовят из верхнего слоя жидкости неоднократным нанесением и растиранием по стеклу. Если в фекалиях обнаружат комочки слизи, то мазки готовят из этих комочков (не менее 10) растиранием между стеклами. Из пораженной ткани делают препараты-отпечатки. Часть препаратов окрашивают по Граму, часть — по Циль — Нильсену. Обычными методами микроб окрашивается плохо.

М и к р о с к о п и я. *M. paratuberculosis* — мелкая палочка длиной 0,5—1,5 мкм, в диаметре 0,2—0,5 мкм, неподвижная, споры и капсулы не образует, кислотоустой-

чивая, грамположительная. В препаратах из патологического материала располагается кучками, гнездами, редко одиночно или по 2—4 клетки. Отмечается полиморфность: палочки могут иметь расширение, напоминая контуры бутылки, ручной гранаты, бесструктурных глыбок, мелких кокков. В мазках из культуры палочки длиннее, стройнее, скученность меньшая, в некоторых клетках видна зернистость.

В связи с тем что выделение возбудителя паратуберкулеза с фекалиями происходит периодически, при сомнительном или отрицательном результате микроскопии исследование повторяют.

Кроме обычной световой можно пользоваться люминесцентной микроскопией препаратов-отпечатков из патологического материала или полученной чистой культуры, используя специфические люминесцирующие сыворотки.

В ы д е л е н и е ч и с т о й к у л ь т у р ы осуществляют посевом на специальные питательные среды (на обычных средах возбудитель паратуберкулеза не растет). Лучший рост наблюдают при добавлении к питательным средам вытяжки из убитых бактерий туберкулеза или кислотоустойчивых сапрофитов (бактерии тимофеевой травы *Bact. phlei*). Часто применяют *среду Дюбо — Смита*: K_2HPO_4 —1,0; Na_2HPO_4 —6,25; $MgSO_4$ —0,01; $CaCl_2$ —0,0005; $ZnSO_4$ —0,0001; $CuSO_4$ —0,0001; лимоннокислого аммонийного железа — 0,05; аспарагиновой кислоты — 1,0; гидролизат казеина — 80 мл; спиртового экстракта микобактерий флеи — 20 мл; сыворотки крупного рогатого скота 20%, пенициллина из расчета 50 ЕД на 1 мл среды и 15,0 агара, дистиллированной воды — 1000 мл. *Среда Данкинса*. *M. phlei* выращивают на 4%-ном глицериновом бульоне, растирают с 10 мл глицерина и 10 мл печеночного экстракта, кипятят, добавляют три свежих яйца, хорошо перемешивают, вносят спиртовой раствор генцианвиолета (2,5% к общему объему среды), фильтруют, разливают в пробирки, скашивают и стерилизуют в аппарате для свертывания сывороток дробно, 3 дня подряд при 80° по 1 ч.

П а т о л о г и ч е с к и й м а т е р и а л предварительно обрабатывают 5%-ным раствором серной кислоты, промывают физиологическим раствором NaCl, растирают в ступке и высевают на описанные среды или на среды Петраньяни и казеиновую с фактором роста и без него. Посевы ставят в термостат при 38°, через 2 дня пробирки парафинируют. Учет производят через 15 дней, затем каждые 5 дней;

рост просматривают с помощью лупы. Первичный рост на казеиновой среде отмечают к 18—20-му дню при сильной обсемененности засеянной ткани. При слабой обсемененности — в более поздние сроки. На плотных средах (элективных) колонии плоские, сухие, серовато-беловатые, с неровными краями. По мере роста края приобретают бугристость, не отличаясь от колоний других микобактерий. В первичных культурах на среде Петраньяни рост отсутствует, что обычно учитывают при идентификации культур. В жидких средах (МПБ с глицерином, синтетические среды) на поверхности образуется нежная беловатая пленка, которая в силу собственной тяжести опускается на дно.

Д и ф ф е р е н ц и а ц и я возбудителя паратуберкулезного энтерита и туберкулеза: 1) культивирование микобактерии паратуберкулеза только на средах с добавлением «фактора роста»; 2) лабораторные животные невосприимчивы к возбудителю паратуберкулеза.

С е р о д и а г н о с т и к а. Пробы сывороток крови исследуют методом РСК по общепринятой методике (с паратуберкулезным антигеном — метаноловым экстрактом микробной массы *M. paratuberculosis*). Реакция неспецифична. Помимо названных методов диагностики паратуберкулеза, широко используется аллергическая диагностика в соответствии с действующей инструкцией — двойной внутрикожной пробой туберкулином (для птиц) или паратуберкулином.

Вопросы для самопроверки. 1. Морфологические, тинкториальные особенности *M. tuberculosis*. 2. Питательные среды для культивирования микобактерий. 3. Культуральные свойства и идентификация видов микобактерий туберкулеза. 4. Дифференцирование микобактерий туберкулеза от кислотоустойчивых сапрофитов. 5. Патологический материал и бактериологическая диагностика туберкулеза. 6. Особенности биопробы при диагностике туберкулеза. 7. Особенности культивирования микобактерий паратуберкулеза. 8. Дифференциация возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза.

ПАТОГЕННЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ

Возбудитель актиномикоза — *Actinomyces bovis* впервые выделен Хорцем (1877). Актиномикоз характеризуется образованием в различных тканях медленно растущей плотной ограниченной припухлости — актиномикомы. В образовании актиномикомы могут участвовать и другие актиномицеты: *A. Israeli* (грамположительный стрептотрикс), *A. Lignieri* (грамотрицательная палочка). В естественных

условиях в основном восприимчив крупный рогатый скот, но отмечены случаи заболевания актиномикозом свиней. Болеет актиномикозом и человек.

Для лабораторной диагностики направляют воспалительный экссудат и кусочки пораженной ткани из актиномикомы (при наружных поражениях), а при убое — кусочки пораженных органов. Исследование заключается главным образом в микроскопии препаратов-мазков и в случае необходимости в посеве на питательные среды. В последние годы установлено, что при внутримышечном заражении крольчат в возрасте 5—7 дней у них появляются актиномикозные поражения спустя 20—25 дней, в пораженной ткани и экссудате которых обнаруживают возбудителя.

Возбудитель актиномикоза морфологически неоднороден в культуре и в пораженной ткани (в организме животного). В патологическом материале находят «зернышки» серо-грязного цвета — «друзы». Препаровальными иглами берут несколько зерен и раздавливают их между двумя предметными стеклами. Один препарат накрывают покровным стеклом и рассматривают в неокрашенном виде при среднем увеличении сухим объективом. Другой мазок красят по Граму. В «друзе» центральная часть гриба представляет собой густое переплетение нитей мицелия, как клубок, а вокруг центральной части — булавовидные радиальные разрастания (рис. 87). Центральная часть — жизнеспособная, при пересевах дает рост гриба, периферическая часть — дегенерированная, омертвевшая и при посевах на питательные среды роста не дает. При окраске центральная часть окрашивается грамположительно, наружные разрастания измененного мицелия — грамотрицательно. В препаратах из культур *A. bovis* видны разветвления одноклеточного тонкого несептированного мицелия диаметром 0,6—0,7 мкм. Мицелий окрашивается грамположительно.

Культивирование и культуральные свойства. *A. bovis* растет на средах плотных и жидких с добавлением сыворотки крови. Аэроб, оптимальная температура роста 37°. Растет медленно — спустя 1—2 недели. На плотных средах (сывороточный МПА, МПЖ) сначала появляются мелкие прозрачные колонии, приобретающие со временем беловато-серый цвет. По мере дальнейшего роста колонии становятся сухими, плотными, с неровной поверхностью, врастающие в глубь среды. При старении культуры колонии становятся как бы посыпанными порош-

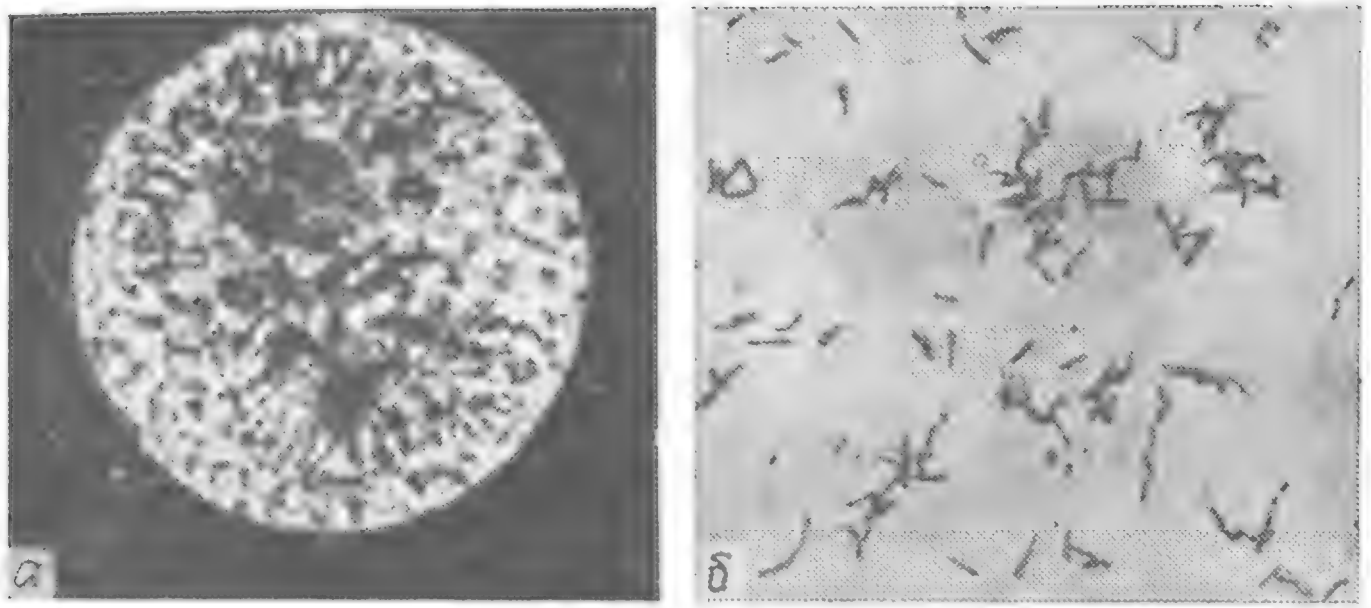


Рис. 87. Возбудитель актиномикоза:

а — друзы из актиномикомы коровы; б — мазок из культуры.

ком мела. В жидкой среде (сывороточный МПБ) рост характеризуется образованием осадка в виде зернышек. Это густое сплетение нитей мицелия. По мере старения культуры на поверхности бульона появляется морщинистая пленка желтоватой окраски, среда остается прозрачной. Выросшую культуру используют для внутримышечного заражения крольчат, которых через 3—4 недели убивают и исследуют с целью диагностики актиномикоза.

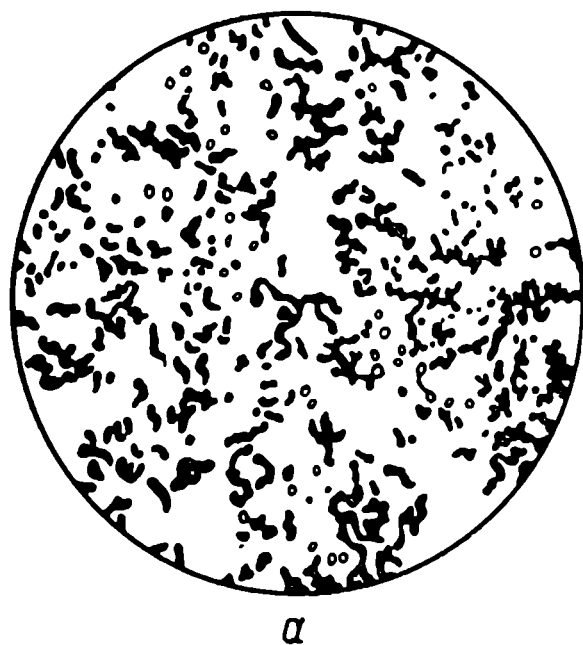
Вопросы для самопроверки. 1. Патологический материал и порядок его исследования на актиномикоз. 2. Питательные среды для культивирования возбудителей актиномикоза. 3. Морфологические, культуральные и тинкториальные свойства возбудителей актиномикоза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ВИБРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

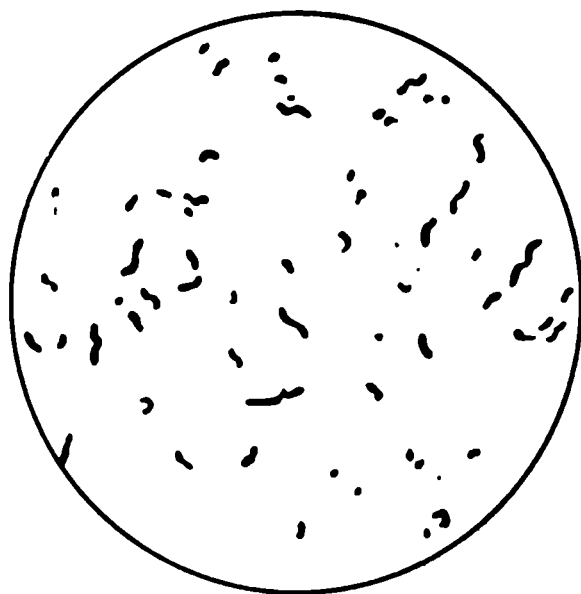
Возбудитель вибриоза — *Campylobacter foetus* — открыт в 1913 г. Относится к семейству Spirillaceae, к роду *Campylobacter*.

C. foetus вызывает заболевание у крупного рогатого скота, характеризующееся поражением родовых путей у коров (метриты, вагиниты). Вибриозом болеют и овцы. Возбудитель локализуется в слизи вагины, матки, фаллопиевых трубах, яичниках. У быков не вызывает заметных изменений половых органов, даже при длительном нахождении в препуции. Возбудитель может находиться в сперме, семенниках, придатках. У коров клинически вибриоз проявляется абортами.

Лабораторная диагностика вибриоза осуществляется бактериологическими и серологическими методами иссле-



а



б



в

Рис. 88. *Campylobacter foetus*:

а — препарат-мазок из культуры; б — мазок из препуциальной слизи быка; в — мазок из содержимого сычуга абортiroванного плода.

дования. Патологическим материалом для бактериологического анализа служит абортiroванный плод или органы плода (желудок с содержимым, перевязанный с двух сторон, другие органы плода, плодовые оболочки), вагинальная слизь, препуциальная слизь, сперма.

Морфология. Вибрионы — извитые полиморфные микроорганизмы, встречаются в виде запятой, буквы S, фигурной алгебраической скобки или спирали (рис. 88). Длина вибриона 1,5—7,0 мкм, диаметр 0,2—0,5 мкм. Споры и капсулы не образует. По Граму окрашивается отрицательно; при окраске по методу Романовского — Гимза на конце видны зерна (гранулы). Подвижны, часто имеют один полярный жгутик, реже на обоих концах клетки по жгутику.

Движение прямолинейное.

C. foetus микроаэрофил, лучше растет при пониженном содержании кислорода и 10%-ной концентрации углекислоты в атмосфере при 37°. Первичные культуры из патологического материала получают на сывороточных или кровяных средах (полужидкий сывороточный агар, плотная кровяная

среда Ленинградского НИВИ, Китт — Тароцци). *Плотная среда*: печеночный отвар — 0,25%, мясная вода — 0,25%, гликокол — 0,25%, NaCl — 0,25%, азотнокислый натрий — 0,015%, растворимый крахмал — 0,1%, соляная кислота химически чистая — 0,03%, водопроводная вода. Автоклавируют при 115° 30 мин, охладив до 60—70°, добавляют 5—10% дефибринированной крови, рН 5,4—5,8. Каждую пробу высевают на несколько чашек растиранием шпателем по поверхности среды. Засеянные чашки ставят в эксикатор с углекислотой и помещают в термостат. Через 3—6 дней появляется рост мелких росинчатых колоний вибриона. Из характерных колоний делают высев на полужидкий кровяной или сывороточный агар для получения чистой культуры.

Лабораторные животные невосприимчивы к вибриозу. Внутривибрионное заражение беременных морских свинок приводит к аборту. К возбудителю вибриоза чувствительны куриные эмбрионы.

Для дифференциации патогенных от непатогенных вибрионов, встречающихся в вагинальной и препуциальной слизи, пользуются следующими показателями.

Вибрионы	Каталазная активность	Образование H ₂ S	Рост в бульоне	
			с 4% желчи	с 3,5% NaCl
Патогенные	+	+	+	—
Непатогенные	—	—	—	+

Каталазную активность определяют добавлением в пробирку с 3-суточной культурой на полужидком агаре (2—3 мл) равного объема перекиси водорода.

Серологический диагноз вибриоза осуществляют методами РА и РДСК (в модификации Триленко). РА можно ставить с кровяной сывороткой, как обычно, но чаще для РА используют влагалищную слизь, в которой у больных животных содержатся антитела. Эта модификация получила название «тампон»-реакции. Марлевым стерильным тампоном берут слизь из шейки матки и сразу в тот же день направляют в лабораторию, где эти пробы выдерживают до следующего дня при температуре 0+4°. Если отправка задерживается до следующего дня,

пробы необходимо сохранить в холодильнике; в лаборатории слизь исследуют в день получения.

При помощи пинцета тампон отжимают, жидкость центрифугируют при 2500 об/мин 15—20 мин. Надосадочную опалесцирующую жидкость разливают в четыре пробирки в количествах 0,5; 0,3; 0,2 и 0,1 мл. Во вторую, третью и четвертую пробирки вливают физраствор до 0,5 мл. Во все четыре пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена — 500 млн. микробных тел (биофабрика выпускает антиген в концентрации 10 млрд. клеток в 1 мл). Для контроля берут еще две пробирки: антиген с физраствором и исследуемую жидкость без антигена. Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 24 ч, затем оставляют при комнатной температуре на 3—6 ч. Если РА в первых двух (а тем более во всех) пробирках положительная, — диагностируют вибриоз.

Методика постановки РДСК (модификация Триленко).

Компоненты реакции: 1) испытуемые сыворотки крови, инактивированные при 65° 30 мин; 2) комплемент в разведении 1 : 30; 3) гемолитическая система, составленная из равных объемов 4%-ной взвеси отмытых эритроцитов барана и четырехкратного титра гемолизина; 4) вибриозный антиген для РДСК, разведенный до титра, указанного биофабрикой, и прогретый 30 мин в кипящей водяной бане.

Модификация в основном заключается в том, что сыворотку инактивируют при 65°, комплемент не титруют, как обычно в РСК. Титруют гемолитическую систему в целом с двумя нормальными сыворотками, затем ставят РДСК (см. схему постановки). Принцип титрации гемолитической системы заключается в следующем: две нормальные сыворотки разливают в несколько пробирок по 0,1 мл (каждую сыворотку в отдельности), выравнивают объемы до 0,5 мл добавлением по 0,4 мл физраствора и помещают в водяную баню при 65° на 30 мин для инактивации. Затем добавляют антиген, разведенный в соответствии с титром, по 0,5 мл в каждую пробирку и комплемент по 0,5 мл (разведенный 1 : 30). Пробирки встряхивают и выдерживают 16—18 ч при низкой температуре (0+4°). Затем во все пробирки добавляют гемолитическую систему в возрастающих дозах: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,4 мл. Если максимальной дозой, в которой произошел гемолиз, будет, например, 0,8, то за титр для работы принимают 0,8 гемолитической системы. Общий объем жидкости в пробирках при постановке РДСК непостоянный и зависит от титра (объема) гемолитической системы.

Схема постановки РДСК

Компоненты реакции, мл	Каждая проба сыворотки в двух пробирках		Контрольные сыворотки	Контрольные эритроциты	Контроль антигена	
	№ 1	№ 2			на самозадержку	на гемотоксичность
Исследуемая сыворотка	0,1	0,05	0,2	—	—	0,5
Физиологический раствор	0,4	0,45	0,8	1,5	—	0,5

Инактивирование в водяной бане при 65° 30 мин

Добавляют:						
Антиген в рабочем титре	0,5	0,5	—	—	1,0	1,0
Комплемент 1:30	0,5	0,5	0,5	—	0,5	—

Пробирки встряхивают, выдерживают 16—18 ч при 0 +4°, по истечении времени добавляют гемолитическую систему

Гемолитическая система в соответствующем титре (на-пример)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Пробирки встряхивают, помещают в водяную баню при 37—38° на 20 мин, результат учитывают, как при РСК

Вопросы для самопроверки. 1. Культурально-морфологические особенности возбудителя вибриоза. 2. Патологический материал и бактериологическое исследование его при вибриозе. 3. Питательные среды и условия культивирования *S. foetus*. 4. Методы серологической диагностики вибриоза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПТОСПИРОЗА

Возбудитель лептоспироза относится к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду Leptospira. Патогенные лептоспиры составляют 18 серологических групп, включающих 124 серологических варианта, из них от сельскохозяйственных животных выделено семь — *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. tarassowi*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomadis*, *L. canicola*, *L. cazackstanika*. Впервые возбудитель лептоспироза был открыт в 1915 г. (Инада и Идо). В Советском Союзе впервые он был выделен Михиным и Ажиновым (1926—1927).

Лептоспироз — инфекционное заболевание разных видов животных, болеет и человек. Наиболее часто болезнь про-

текает с кратковременной лихорадкой в острой и подострой форме, отмечают гемоглобинурию (особенно у телят), желтушность слизистых оболочек. У коров и свиноматок возможны аборты. Переболевшие животные длительное время остаются лептоспиросителями (и выделителями).

Микробиологическая диагностика складывается из бактериологического и серологического исследований.

Для бактериологического исследования в лабораторию направляют: при жизни животного — мочу, кровь в период лихорадки; посмертно — труп животного или кусочки паренхиматозных органов, почку, транссудат, из грудной и брюшной полостей перикардальную жидкость, мочевого пузыря с содержимым, абортированный плод или органы плода. Жидкие субстраты отсасывают в стерильные пробирки. Патологический материал доставляют с нарочным в опечатанном ящике не позднее 6 ч после гибели животного в летнее время и 12 ч зимой (лептоспир быстро гибнут). Воду на наличие лептоспир направляют в лабораторию в бутылках (колбах) в количестве до 2 л.

Порядок исследования патологического материала: готовят препараты для микроскопирования в нативном неокрашенном виде методом раздавленной капли в темном поле зрения. Лептоспир плохо воспринимают анилиновые краски. По Граму они окрашиваются отрицательно, по методу Романовского — Гимза только при длительном выдерживании (48 ч) — красятся в розово-фиолетовый цвет, по методу Киктенко — на бесцветном фоне видны красно-фиолетовые лептоспир. Этот метод заключается в том, что на нефиксированный препарат наносят специальный раствор (0,2 таннина, 2 мл формалина, 5 мл 4%-ного спиртового раствора йода, 100 мл дистиллированной воды), выдерживают его 1 мин, сливают и наносят другой краситель (1,0 генцианвиолета в 100 мл 25° этилового спирта) на 50 с при подогревании. После этого препарат промывают, высушивают, микроскопируют под иммерсией.

Морфология. Лептоспир представляют собой тонкие длинные спиралеподобные микроорганизмы длиной 10—15 мкм, в диаметре 0,1—0,2 мкм, количество спиралей (завитков) 10—12 и более (рис. 89). Споры и капсулы не образуют. На концах лептоспир имеют утолщения. Движение маятникообразное. Подвижность сохраняется не более двух часов с момента взятия крови или мочи.

Выделение чистой культуры производят посевами патологического материала на полусинте-

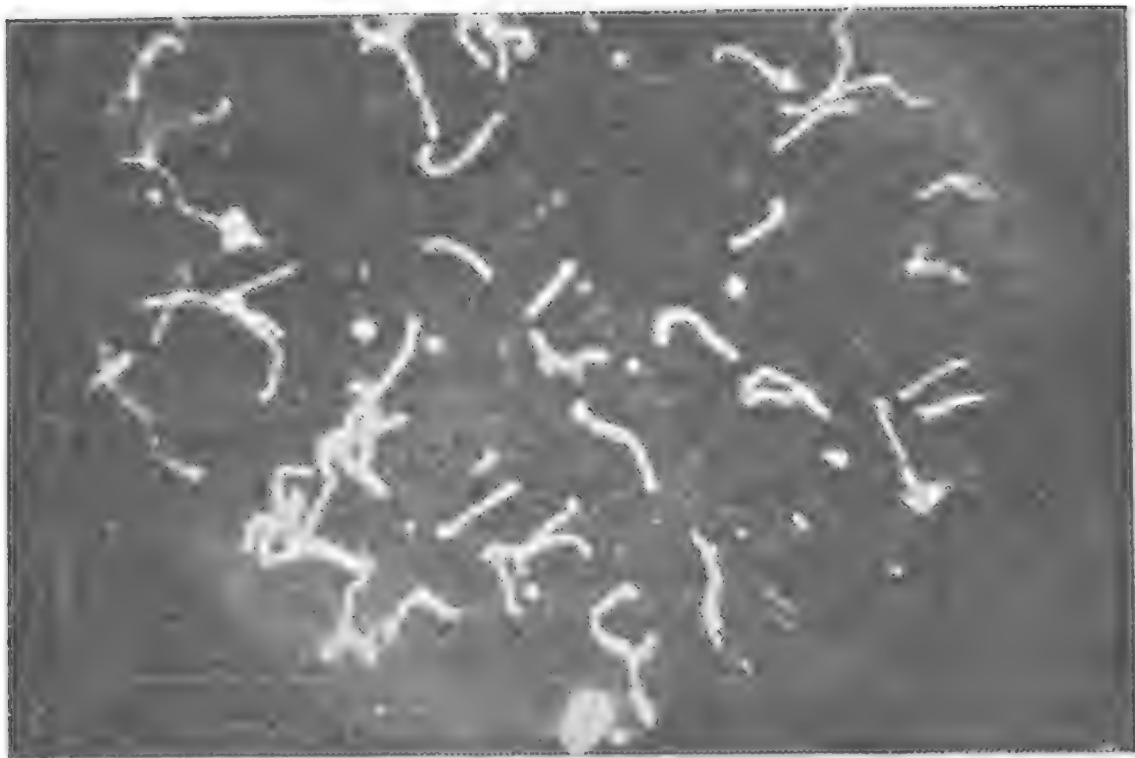


Рис. 89. Лептоспиры под люминесцентным микроскопом.

тическую среду ГНКИ, состоящую из овечьего альбумина, воды и компалона (фактора роста), или на среды Любашенко и Терских, в основу которых взят фосфатно-буферный раствор Зеренсена с 5% кроличьей сыворотки и 1% пептона, дистиллированная вода, рН 7,2—7,4. Лептоспиры — факультативные аэробы, оптимальная температура 28—30°, культивируют 7—20 дней. Среда остается прозрачной, рост культуры определяют микроскопированием препаратов из нее. Если макроскопически виден рост (помутнение среды и осадок) — культура загрязнена.

Патогенность выделенной культуры определяют б и о п р о б о й: заражают морских свинок или золотистых хомяков, крольчат 3—5-недельного возраста. Культуру (или взвесь исследуемого растертого материала) инъецируют подкожно или внутрибрюшинно хомякам в дозе до 1 мл, крольчатам — 2—3 мл (по два животных на каждую пробу). Одного убивают через 4—5 дней, второго (если не погибнет) — спустя 14—16 дней, вскрывают и проводят бактериологическое исследование.

Лептоспиры продуцируют ферменты (плазмокоагулазу, липазу и лецитиназу) и экзотоксины — гемотоксин, некротоксин. Имеется эндотоксин.

В культуре ткани лептоспиры проявляют цитопатогенное действие.

Для прижизненной диагностики лептоспироза чаще используют с е р о л о г и ч е с к и е м е т о д ы. Кровь от животных допускается исследовать лишь через два месяца

после их вакцинации. Самым распространенным методом является *реакция микроагглютинации* (РМА) со свежей или консервированной (высушиванием на фильтровальной бумаге или 0,5%-ным раствором фенола) сывороткой. Сначала готовят разведения сыворотки — 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 (при необходимости и больше), затем добавляют антиген — живые культуры лептоспир.

Удобно ставить реакцию в такой модификации:

из каждого разведения сыворотки (начиная с большего) по 0,1 мл вносят в 6—13 лунок в пластине для серологических реакций или в пробирки Флоринского в зависимости от количества имеющихся в лаборатории антигенов — живых культур диагностических штаммов лептоспир. Каждый антиген — 5—15-суточная культура лептоспир с концентрацией 70—100 микробных тел в поле зрения микроскопа (предварительная проверка) — вносят в четыре лунки (пробирки) с разными разведениями сыворотки по 0,1 мл. Электролитной средой является 0,85%-ный раствор хлорида натрия. Антигены с сывороткой встряхивают, помещают в термостат при 30° на 1 ч. Контролем служит культура лептоспир с физиологическим раствором также по 0,1 мл.

Учет реакции производят микроскопически: из каждой пробирки (или лунки) готовят препарат — раздавленную каплю, микроскопируют его в темном поле микроскопа при увеличении 20×10. При наличии гомологичных антигену антител в сыворотке происходит агглютинация — образуются агглютинаты склеенных лептоспир в виде паучков или пучков, сохраняющих подвижность на свободных концах (рис. 90). Результат РМА оценивается в крестах: + + + + — агглютинация 100% лептоспир, + + + — агглютинация 75%, + + — 50%, + — 25% микробов; минус — агглютинация отсутствует. В небольших разведениях сыворотки наблюдается набухание и непо-



Рис. 90. Агглютинация лептоспир («паучки»).

движность, зернистость и распад лептоспир (лизис). Положительная реакция признается с оценкой в четыре и три креста, два креста — сомнительный результат.

Помимо РМА применяют обычную РА, РСК и РИФ по общепринятым методикам их постановки.

Вопросы для самопроверки. 1. Возбудители лептоспироза, их морфологические, тинкториальные и культуральные особенности. 2. Взятие, пересылка и микробиологическое исследование материала при диагностике лептоспироза. 3. Особенности микроскопирования лептоспир. 4. Методы серологической диагностики лептоспироза.

МИКОПЛАЗМЫ

Возбудитель перипневмонии крупного рогатого скота — *Mycoplasma mycoides*, открыт Нокаром и Ру (1898), исследовавших плевральную жидкость коров, больных перипневмонией. В литературе эти микроорганизмы известны под названием «организмы перипневмонии», сокращенно ОПП.

По современной классификации они относятся к порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceae*, роду *Mycoplasma*.

Перипневмония (повальное воспаление легких) крупного рогатого скота характеризуется подострым и хроническим течением. Температура тела повышается до 40° (и выше), у животных болезненный сухой кашель, прекращается удои, появляется запор, моча темного цвета с высоким содержанием белка. У тяжело больных наблюдают слизистое, иногда с примесью крови, истечение из носа.

П а т о л о г и ч е с к и м м а т е р и а л о м для прижизненной диагностики служит бронхиальная слизь, секрет молочной железы, моча. После убоя исследуют плевритический экссудат, лимфу, медиастинальные, бронхиальные, предлопаточные лимфоузлы, секвестры (пораженные участки) легких. При необходимости указанные органы консервируют в 30—40%-ном водном растворе глицерина или в 0,5%-ном растворе фенола.

М и к р о б и о л о г и ч е с к и е и с с л е д о в а н и я патологического материала включают микроскопирование препаратов, окрашенных по методу Романовского — Гимза (продолжительность окраски 48 ч), высев на специальные питательные среды. При атипичных клинических признаках болезни и нечетко выраженных патологоанатомических изменениях прибегают к биопробе.

Микоплазмы перипневмонии (рис. 91) имеют величину в пределах 125—250 нм, полиморфные, нитчатые, коккоподобные, звездчатые формы. У микоплазм нет клеточной стенки, чем и объясняется их полиморфизм. Клеточное содержимое (цитоплазма) снаружи покрыто цитоплазматической мембраной.

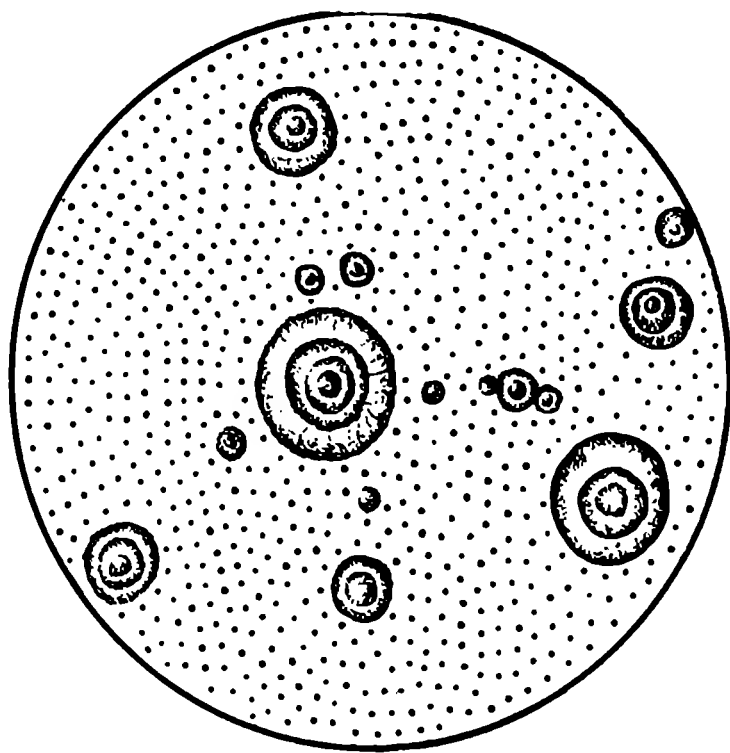


Рис. 91. Колонии перипневмонийного микроба на сыровороточном агаре.

Культурально-биохимические свойства. Микоплазмы аэробы, оптимальная температура роста 37—38°, рН среды 7,8—8,0. Чистую культуру получают при посеве на мартеновский бульон и мартеновский агар с добавлением 8% сыворотки крови. В жидкой среде рост проявляется через 2—3 дня очень слабым помутнением (легкой опалесценцией), а на сыровороточном агаре — в виде слизистого налета. Микроб не разжижает желатину, не образует индола, ферментирует крахмал, глюкозу, маннит, гликоген, фильтраты культур лизируют эритроциты лошади. Культивируются на куриных эмбрионах. Для биопробы подкожно заражают телят, так как лабораторные животные невосприимчивы к возбудителю.

Для массового обследования животных применяют РСК и реакцию конглютинации (РК). Методика постановки РСК общепринятая и описана в общей части. Антигеном для РСК и РК служит либо вторичная лимфа, полученная из плевральной полости после экспериментального подкожного заражения телят, или бульонная культура возбудителя. Лимфу, разведенную дистиллированной водой 1 : 4, 1 : 6, прогревают 10 мин при 100°, консервируют 0,5%-ным фенолом. Загрязненный материал фильтруют и разводят мартеновским бульоном (1 : 80). В свежем материале посторонней микрофлоры нет. РСК выявляют инкубационные, а также субклинические формы заболевания.

Вопросы для самопроверки. 1. Возбудитель перипневмонии, морфологические и культуральные особенности. 2. Патологический материал, его микробиологическое исследование для диагностики перипневмонии. Особенности биопробы. 3. Серологическая диагностика перипневмонии.

Возбудитель контагиозной агалактии коз и овец — *Mycoplasma mycoides*, var. *agalactiae* (открыт в 1923 г.). Вызывает заболевание, характеризующееся поражением главным образом молочной железы, отсутствием секреции молока; возможно поражение глаз (кератит, конъюнктивит), суставов. При остром течении болезни животные погибают через 5—8 дней. Для микробиологического исследования при жизни используют молоко (или секрет вымени при агалактии), выделения из пораженных глаз, а посмертно — паренхиматозные органы, лимфоузлы, содержимое абсцессов. Из патологического материала готовят препараты и производят посевы на питательные среды. Материал наносят на предметное стекло, растирают его тонким слоем, высушивают 24 ч. Для удаления солей, растворимых белков препарат погружают в дистиллированную воду на 10 мин, высушивают, фиксируют этиловым спиртом 10—15 мин и окрашивают по методу Романовского — Гимза до 48 ч.

M. mycoides — полиморфный микроб величиной 125—250 нм, аэроб. Культивируют в бульоне и агаре Мартена с добавлением 15—20% сыворотки, рН 7,4—8,0 при температуре 37°. Растет также на среде Хоттингера с добавлением сыворотки и 1—2% лактозы. На сывороточном агаре с лактозой рост в виде мелких колоний (лучше просматривать под лупой). Колонии молодых культур легко снимаются с поверхности плотной среды, старые культуры — с трудом, так как они врастают в глубь среды. Микоплазмы культивируют в некоторых культурах клеток (например, клеток почки эмбриона овцы, куриных фибробластов и др.).

Лабораторные животные невосприимчивы к возбудителю агалактии. Поэтому для биопробы используют овец и коз. Чистую культуру вводят через сосковый канал, или внутривыменно (можно также подкожно, интраторакально). Инкубационный период длится 1—24 дня. Бактериологическую диагностику (из-за трудности проведения) осуществляют только для первичного установления агалактии в хозяйстве. Решающее значение имеет выделение возбудителя из молока, суставов.

Возбудитель респираторного микоплазмоза птиц. Заболевание описал Нельсен (1953) и характеризовал возбудителя как коккоподобный микроб. Параллельно и независимо от этого из экссудата кур, больных респираторным заболеванием, и индеек, больных синуситом, Макргам и Уонг (1952) выделили микроорганизмы типа перипневмо-

нии (ОТПП). По современной номенклатуре, с 1961 г. возбудитель называется *Mycoplasma gallisepticum*.

Морфологически микроб не отличается от других микоплазм: полиморфен, размер колоний до 500 нм. Препараты-мазки окрашивают по Гимза 2 ч, предварительно фиксируя их метиловым спиртом. Исследуют соскобы со слизистой оболочки гортани, синусов, трахеи и легких.

Культивирование. Предварительно суспензию исследуемого материала на курином бульоне готовят из расчета 1 : 10, обезвреживают от банальной микрофлоры добавлением 0,1 мл раствора уксуснокислого таллия (1 : 400) и 2500 ЕД пенициллина на 1 мл суспензии, выдерживают при комнатной температуре 40—60 мин, затем высевают на питательные среды. Банальную микрофлору можно удалить и центрифугированием суспензии при 3500—4000 об/мин 30—40 мин. Надосадочную жидкость обрабатывают пенициллином или пропускают через фильтровальные пластинки Зейтца, а фильтрат уже обрабатывают пенициллином (2500—3000 ЕД на 1 мл жидкости).

Для культивирования чаще используют среду Эдварда, состоящую из отвара сердечной мышцы крупного рогатого скота с добавлением 1% пептона, рН 8,0. Перед использованием добавляют 20% стерильной сыворотки крови лошади (или рогатого скота, свиней, птиц) и 10% экстракта дрожжей. При добавлении 2% агара получают плотную, при добавлении 0,3% — полужидкую среду. Рост в жидкой среде 24—48 ч. На плотной среде появляется рост мелких прозрачных колоний, шероховатых, неправильной формы, вдавленных в центре. Культивировать можно и на 7—9-дневных куриных эмбрионах, заражая последних в желточный мешок или в хориоаллантоисную полость. Эмбрионы погибают через 5—8 дней.

Биопробу ставят на индюшатах или цыплятах 1—2-месячного возраста. Суспензию патологического материала в дозе 0,5 мл инъецируют интраназально или интратрахеально, или в грудной воздухоносный мешок.

Для серологической типизации возбудителя применяется РГА. В РГА определяют гемагглютинационную активность культуры микоплазм. 5-суточную культуру микоплазм на жидкой среде Эдварда (или 8—10-суточную на среде Мартена или на курином бульоне с 20% сыворотки лошади и 0,5% глюкозы) разводят в физиологическом растворе от 1 : 2 до 1 : 32. Отдельно готовят 1%-ную взвесь отмытых эритроцитов кур. Затем к разным раз-

ведениям культуры добавляют по 0,5 мл взвеси эритроцитов; пробирки встряхивают, выдерживают при комнатной температуре 45—60 мин и учитывают результат.

Вопросы для самопроверки. 1. Патологический материал и исследование его при контагиозной агалактии коз и микоплазмозе птиц. 2. Морфологические и тинкториальные особенности возбудителей агалактии коз и микоплазмоза птиц. 3. Культивирование микоплазм. 4. Особенности биопробы при диагностике агалактии коз и микоплазмоза птиц. 5. Серологическая диагностика микоплазмоза птиц.

РИККЕТСИИ

Риккетсии относят к семейству Rickettsiaceae, порядку Rickettsiales, классу Microtetrabiolae. Впервые описаны Риккетсом (1909—1910), в честь которого эти микроорганизмы получили свое родовое название. Данная группа включает много видов, вызывающих разные заболевания животных и человека. При многих риккетсиозах возбудители переносятся членистоногими кровососущими — клещами, вшами, блохами.

Риккетсии — полиморфные микроорганизмы, сходные морфологически с бактериями (овальные, кокковидные, палочковидные формы). Палочковидные формы длиной 0,3—1,2 мкм, в диаметре 0,2—0,3 мкм. Риккетсии трудно поддаются красителям, биполярны, грамотрицательные.

По методу Романовского — Гимза в отличие от других микроорганизмов окрашиваются в розовый цвет (метахроматически).

Возбудитель Ку-лихорадки — *Rickettsia burneti* (1939). Заболевание было описано в Австралии (1937) Дерриком. Возбудитель получил название по первоначальной букве провинции Квисленд (Queensland). Вызывает зоонозный риккетсиоз (болеют крупный рогатый скот, овцы и человек). Переносчик — клещ рода Дермацентор. Человек инфицируется главным образом через молоко. Возбудитель кокковидной формы, хотя и встречаются палочковидные и нитевидные формы.

Культивирование возможно в желточном мешке куриных эмбрионов. Культивированными риккетсиями возможно осуществить биопробу — любым способом заражают морских свинок, сусликов или хомяков. Заболевание проявляется лихорадкой. Белые мыши, белые крысы, кролики устойчивы к данному возбудителю; при заражении их внутривенно или в переднюю камеру глаза (после предва-

рительной анестезии) риккетсиоз протекает бессимптомно. При убое зараженных животных возбудителя обнаруживают в почках, селезенке.

Д и а г н о с т и к а основывается на **б и о п р о б е**: кровью больного животного, взятой в период лихорадки, заражают морскую свинку внутрибрюшинно или интратестикулярно. В момент наивысшего подъема температуры свинок убивают, в мазках из печеночной ткани или селезенки обнаруживают риккетсии.

При риккетсиозах применяют также серологические (РА, РП, РГА, РСК) и аллергические методы диагностики. Антиген для РА — консервированная взвесь риккетсий, для РСК и РП — вытяжка из желточного мешка инфицированных эмбрионов. Используют также люминесцентно-серологический метод.

Возбудитель гидроперикардита — *Rickettsia ruminantium*, открыт Ковдри (1925), кокковидной формы, развивается в эндотелии стенки сосудов. Болеют гидроперикардитом крупный рогатый скот, овцы, козы. Переносчиком являются клещи. Заболевание характеризуется высокой температурой ($41-42^{\circ}$), общей слабостью, судорогами. Возможны аборт. Течение острое. **М а т е р и а л о м** для исследования служит кровь больного животного, клетки РЭС (костный мозг, селезенка). В мазках крови в период лихорадки (при жизни) и в мазках из соскобов яремной или поллой вены (посмертно) обнаруживают возбудителя. **Б и о п р о б у** проводят на овцах или кроликах, морских свинках, белых крысах. Заражают интрацеребрально или внутрибрюшинно. (При гистологическом исследовании патологического материала риккетсии обнаруживают в эндотелии сосудов мозга, почек.)

При **риккетсиозном конъюнктивите овец** возбудителя (*Rickettsia ovis*) можно обнаружить в препаратах из материала, взятого с конъюнктивы пораженных глаз.

Риккетсиозный моноцитоз собак характеризуется лихорадкой, появлением сыпи, выпадением шерсти. Переносчик — клещ рода Рипицефалус. В мазках из крови или пунктата печени, легких — риккетсии (*Rickettsia canis*) концентрируются кучками в моноцитах.

Вопросы для самопроверки. 1. Общая характеристика риккетсий и заболеваний животных, вызываемых реккетсиями. 2. Материал и методы исследования с целью диагностики отдельных риккетсиозов. 3. Культивирование риккетсий. 4. Антигены и серологическая диагностика риккетсиозов.

Возбудители микозов

В о з б у д и т е л и д е р м а т о м и к о з о в (стригущего лишая и парши) относятся к несовершенным грибам к порядку Hyphomycetales, родам Trichophyton, Microsporum и Achorion.

Возбудитель стригущего лишая рода Trichophyton, впервые описан Малмстоном (1845). Название гриба образовалось из двух слов: tricho — волос, phytum — растение. Основные виды трихофитона: а) Tr. faviforme, Tr. verrucosum вызывают заболевание преимущественно у молодняка крупного рогатого скота и овец, реже у лошадей, собак, верблюдов; б) Tr. equinum — возбудитель лишая лошадей (1—2% случаев); в) Tr. gypseum, Tr. mentagrophytes — основные возбудители трихофитии у мышей, крыс, собак, кроликов, кошек, морских свинок, пушных зверей, редко лошадей, крупного рогатого скота.

Трихофития характеризуется появлением облысевших участков кожи, в первую очередь в области головы, затем поражение может распространиться дальше по поверхности тела животного. В зоне пораженных участков волос хрупкий, ломкий, отторгающиеся чешуйки эпидермиса иногда слипшиеся в виде корочек. На концах оставшихся волос заметны серовато-белые «чехлы» (споры гриба).

Для лабораторного исследования делают соскоб пораженного эпидермиса с захватом волос на границе со здоровой тканью. Готовые препараты из патологического материала микроскопируют. При сомнительном результате производят посев на плотную среду Сабуро. Предварительно соскобы обрабатывают 10%-ным раствором щелочи (KOH или NaOH) в течение 15—30 мин. Препаровальной иглой (или бактериологической петлей) несколько волосков переносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом. Иглу (или петлю) следует сразу хорошо прокалить на пламени горелки. Приготовленный препарат («раздавленная капля») микроскопируют под объективом сухой системы средней степени увеличения. На пораженном волосе внутри и снаружи его отчетливо видны расположенные рядами круглые, хорошо преломляющие свет короткие гифы мицелия гриба («споры») (рис. 92).

Для выделения ч и с т ы х к у л ь т у р материал после обработки щелочью хорошо промывают стерильным физио-

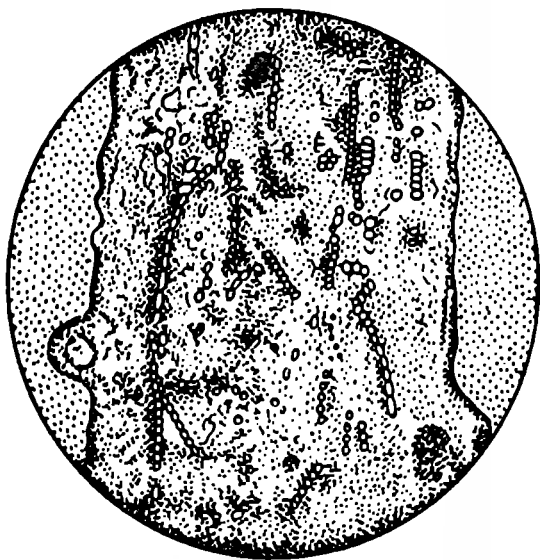


Рис. 92. Возбудитель трихофитии в пораженном волосе.

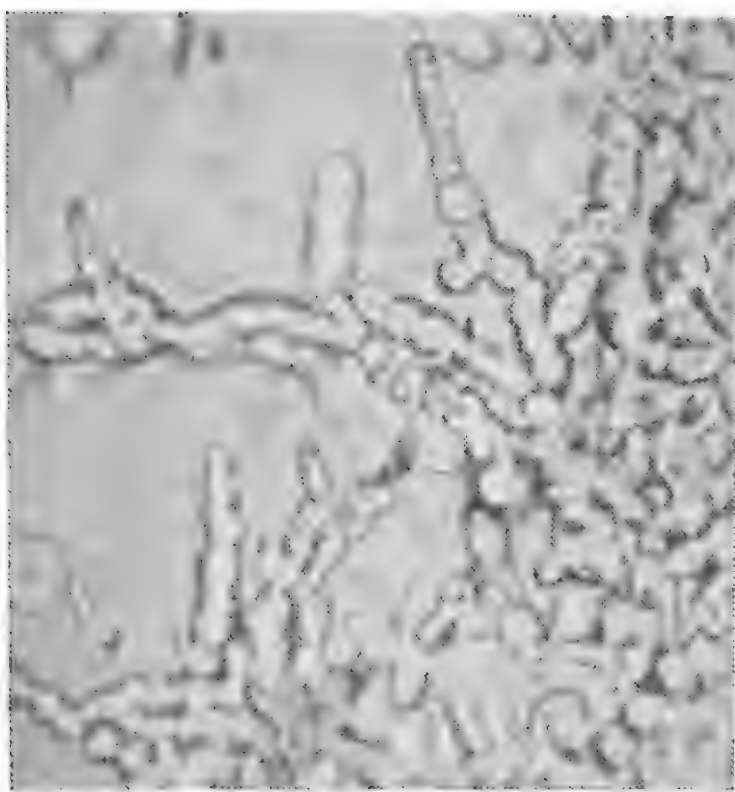


Рис. 93. Мицелий и цепочки артроспор в культуре трихофитона.

логическим раствором при центрифугировании. Обломки волосков длиной 1—2 см переносят на агар Сабуро в 8—10 пробирок и располагают их на расстоянии 1 см друг от друга.

Культивируют при 26—28° в аэробных условиях. Из-за сильной загрязненности патологического материала в питательную среду добавляют пенициллин и стрептомицин по 100—200 ЕД/мл (рис. 93).

Время появления и характер роста колоний зависят от вида гриба — возбудителя дерматомикоза.

Возбудитель стригущего лишая рода *Microsporum* открыт Груби (1843). Различают три вида данного рода гриба: *Microsporum lanosum*, *M. equinum* и *M. gypseum*. Стригущий лишай, вызванный грибом рода микроспорум, по клиническому проявлению не отличается от трихофитии, за исключением того, что волосы в пораженных участках кожи головы, ног обламываются на расстоянии более близком к поверхности кожи. К микроспории восприимчивы кошки, собаки, лошади, пушные звери, обезьяны, тигры, а также человек (особенно дети). Взятие патологического материала, порядок его исследования осуществляются так же, как при трихофитии.

В культурах гриб микроспорум имеет мицелиальную форму. Мицелий септирован, многоклеточный, почти такой же, как и мицелий трихофитона. Отличие только в поражен-



Рис. 94. Препарат из волоса собаки; мелкие споры *Microsporum lanosum*.

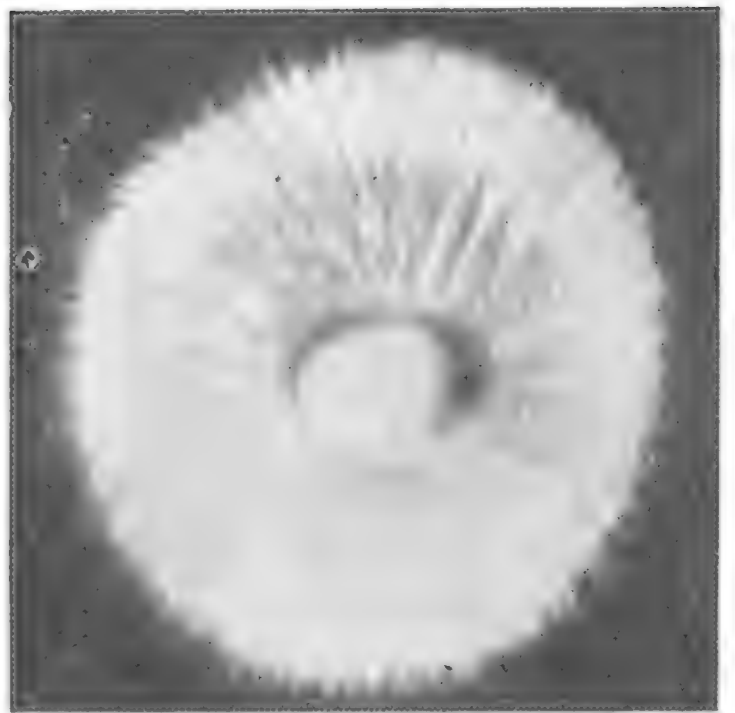


Рис. 95. Агаровая культура *M. lanosum*.

ном волосе: гриб располагается не рядами, а беспорядочно разбросан, обычно в виде «сотообразных» скоплений (рис. 94, 95, 96).

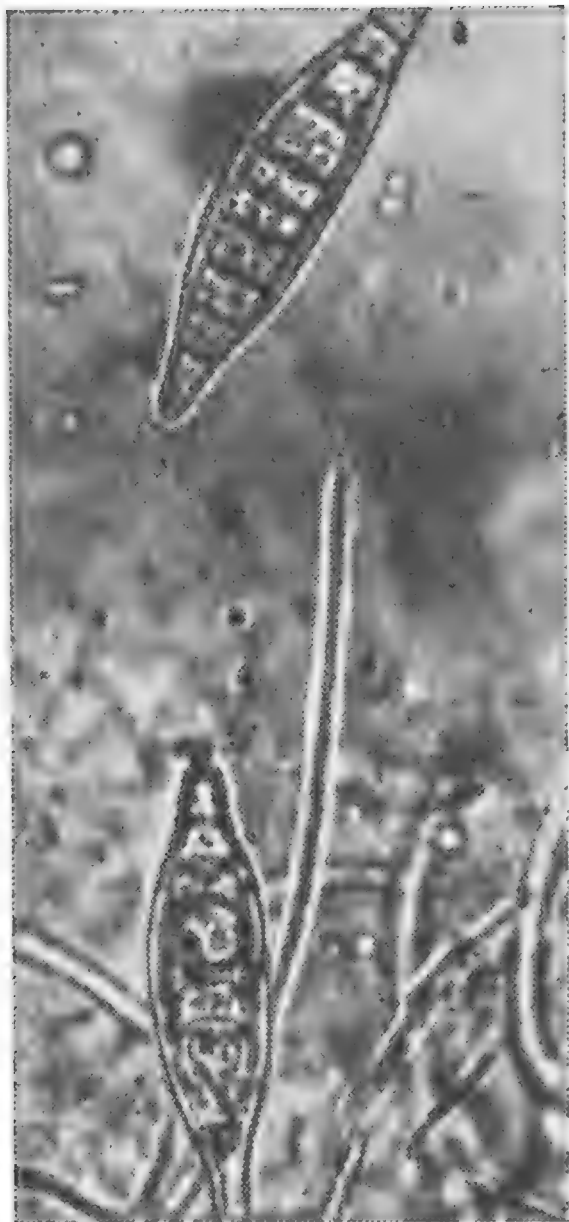


Рис. 96. Макроконидии *M. lanosum*.

Необходимо проводить дифференциацию трихофитона и микроспорума ввиду различного их антигенного строения.

Люминесцентную диагностику микроспории осуществляют с помощью ПРК-4 с фильтром Вуда в темном помещении. При наличии возбудителя последний обнаруживают по характерному зеленоватому свечению под действием ультрафиолетовых лучей (возбудители трихофитии не флюоресцируют). Возможна идентификация видов и родов возбудителей трихофитии и микроспории методом флюоресцирующих антител.

Различие в антигенном строении разных видов дерматомицетов имеет значение в создании профилактических специфиче-

ских биопрепаратов. Биологическая промышленность выпускает вакцину для иммунизации животных против стригущего лишая с использованием культуры гриба *Tr. faviforme* (вакцина ЛТФ-130).

Для постановки биопробы стригущий лишай можно воспроизвести у морских свинок, кроликов путем втирания культуры возбудителя или патологического материала в скарифицированную кожу.

Вопросы для самопроверки. 1. Возбудители стригущего лишая, их патогенность для сельскохозяйственных животных. 2. Правила взятия и обработки патологического материала для лабораторного исследования. 3. Морфологические особенности возбудителей трихофитии и микроспории. 4. Специальные питательные среды и культуральные свойства дерматомицетов. 5. Дифференцирование родов грибов *Micosporum* и *Trichophyton*, патогенных для животных и человека.

Возбудитель парши. Парша как дерматомикоз клинически проявляется так же, как и стригущий лишай, но при парше поражения более глубокие. Возбудители парши относятся к роду *Achorion*. *Ach. gallinae* поражает кожу, перья птицы, реже вызывает заболевание у млекопитающих. *Ach. schönleini* вызывает заболевание у человека; спорадически болеют собаки, кошки, обезьяны, редко телята.

Отбор и пересылка патологического материала для лабораторного исследования производятся так же, как при диагностике трихофитии. В культуре гриб *Achorion* (рис. 97) имеет многоклеточный септированный мицелий, в препаратах из патологического материала находится в виде тонкого септированного мицелия со спиралевидными «воздушными спорами» на концах. Хорошо видны хламидоспоры с двухконтурной оболочкой. Хламидоспоры круглой или многогранной формы располагаются цепочками или группами. Диаметр споры 4—8 мкм. В пораженном волосе при микроскопировании видны темные образования — пузырьки воздуха.

Культивируют возбудителя парши на тех же питательных средах, что и для возбудителей стригущего лишая. На глюкозном агаре Сабуро колонии гриба белого цвета, бархатистые, гладкие, при старении складчатые, пигментированные (розового цвета).

Вопросы для самопроверки. 1. Отличительные особенности гриба рода *Achorion* от других дерматомицетов. 2. Питательные среды для культивирования возбудителя парши. 3. Патологический материал, его подготовка и микологическое исследование при диагностике парши.

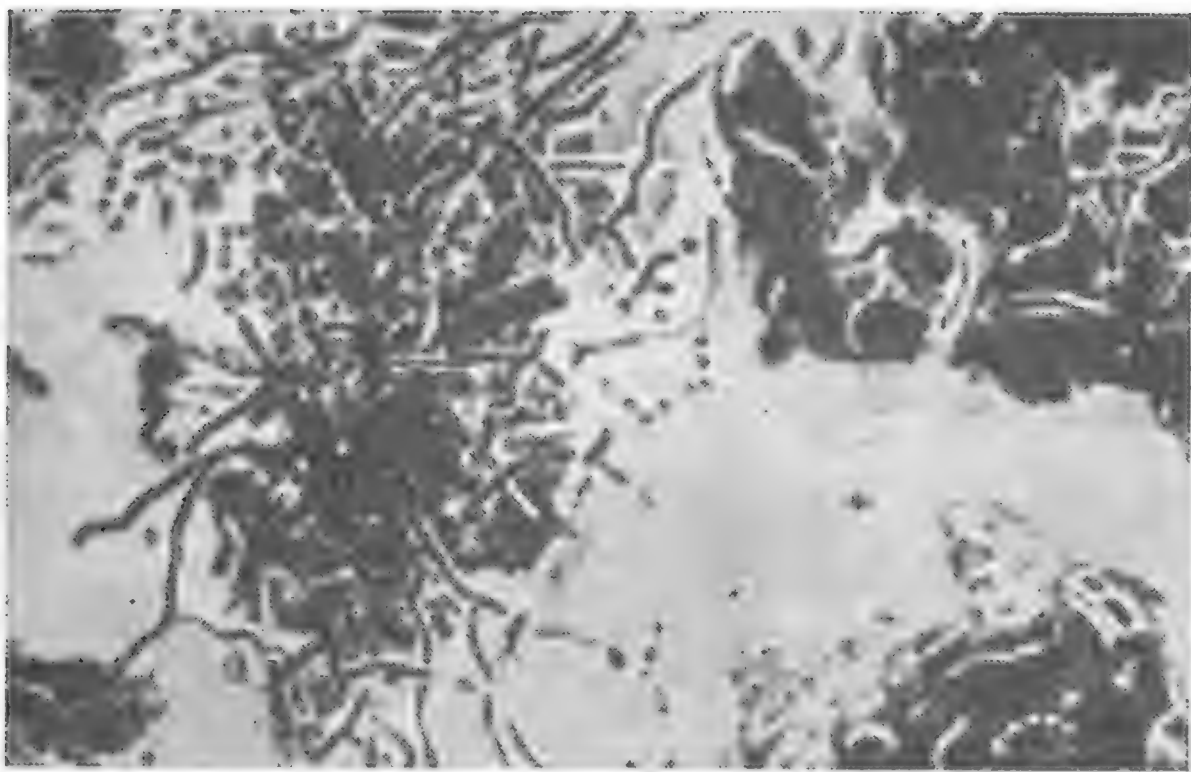


Рис. 97. Мицелий и споры возбудителя парши птиц.

В о з б у д и т е л ь к а н д и д а м и к о з а принадлежит к роду *Candida*, включающему семь видов. Наиболее частым возбудителем заболевания является вид *Candida albicans*, реже *Cand. tropicalis* и др. Впервые возбудитель был выделен и описан Робинсом (1853), как *Oidium albicans*. Современное его название дано в 1923 г. Кандидамикоз (молочница) характеризуется воспалением с последующим некрозом слизистых оболочек пищеварительного тракта, начиная с ротовой полости, образованием налета («пленок») на поверхности слизистой. Кандидамикозом болеют птицы, особенно молодняк, телята и реже животные других видов. У взрослого крупного рогатого скота поражаются легкие, вымя; у поросят заболевание проявляется афтозным стоматитом и энтеритом. К кандидамикозу восприимчив человек, особенно грудные дети.

П а т о л о г и ч е с к и й м а т е р и а л для микологического исследования: у больной птицы и млекопитающих берут пинцетом пленки (налет) со слизистой оболочки ротовой полости; у коров исследуют дополнительно молоко (пробы из пораженной доли вымени). Посмертно делают соскобы со слизистой пищеварительного тракта, а также отбирают кусочки пораженных органов.

Павшую птицу и трупы мелких животных направляют целиком.

Исследование патологического материала включает: микроскопирование нативных препаратов (методом придавленной капли) или фиксированных и окрашенных по Граму,

посев патологического материала для получения культуры гриба и биопробу.

Материал для микроскопического исследования готовят так же, как при диагностике дерматомицетов.

Возбудитель кандидамикоза — дрожжеподобные, круглые и овальные почкующиеся клетки, диаметром 2,5—6 мкм. Мицелий септированный (многоклеточный), распадающийся на бластоспоры. По Граму окрашивается положительно, при этом четко видны структурные элементы клетки.

Чистую культуру выделить трудно, так как исследуемый материал загрязнен бактериальной микрофлорой. Поэтому перед посевом материала на питательные среды его обрабатывают 0,5%-ным раствором фенола или формалином, в питательные среды добавляют пенициллин и стрептомицин. Культивируют на глюкозном агаре Сабуро, рН 6,0—6,5 (для очистки от бактериального загрязнения рекомендуют применять среды с рН 2,5—3,0) при 37°. Рост колоний *Candida* отмечают через 2—4 суток в виде средней величины гладких образований на поверхности среды, иногда с радиально расположенными лучами, сливкоподобного кремового цвета. Колонии вырастают и в глубь среды. Встречаются колонии S- и R-формы (рис. 98, 99). В жидких питательных средах грибок растет в виде густого крошковатого осадка; образует пристеночное кольцо.

Для дифференциации видов гриба используют посев на среды: с глюкозой, фруктозой, маннозой, мальтозой, галактозой, сахарозой, раффинозой, левулезой и индикатором Андрэдэ. Ферментативная способность по отношению к перечисленным углеводам у разных видов неодинаковая.

Патогенность гриба определяют заражением лабораторных животных 1 мл взвеси 48-часовой культуры, выращенной на среде Сабуро, содержащей 300—500 тыс. клеток. Кроликов заражают внутривенно, белых мышей внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл. Животные погибают на 2—7-й день в результате генерализованного процесса с образованием белых гранул в почках, печени, сердце и других органах.

Вопросы для самопроверки. 1. Возбудители кандидамикоза, их морфологические, культурально-биохимические свойства. 2. Патогенные свойства грибов рода *Candida*. 3. Патологический материал, порядок проведения микологического исследования для диагностики кандидамикоза.

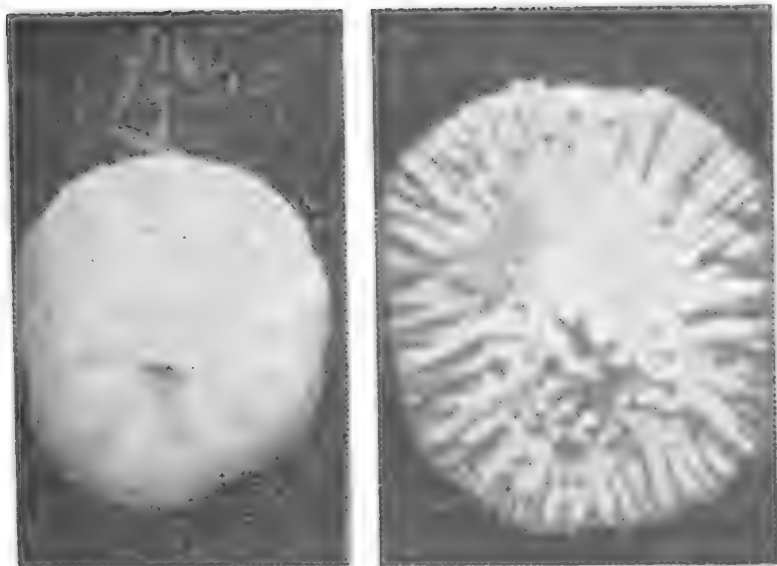


Рис. 98. Колонии *Candida albicans* на 17-е сутки роста:
S- и R-форма.



Рис. 99. Мицелий с бластоспорами *Candida albicans*.

В о з б у д и т е л ь э п и з о о т и ч е с к о г о л и м - ф а н г и т а (бластомикоза, африканского сапа) — *Histoplasma farciminosus* (*Cryptococcus farciminosus*). Болезнь цельнокопытных, характеризуется хроническим течением, поражением лимфатических узлов и лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки. Клинически отмечают плотные узелки в толще кожи с последующим их размягчением и развитием абсцессов. После вскрытия абсцессов образуются язвы с гнойным экссудатом. Края язв неровные.

М и к о л о г и ч е с к и й д и а г н о з лимфангита основывается на обнаружении возбудителя в микроскопируемых препаратах-мазках из гнойного экссудата язв, который обычно является патологическим материалом для отправки в лабораторию. В сомнительных случаях производят посев из гноя на питательные среды. Возбудитель — криптококк трудно культивируется. Биопробу на лабораторных животных не проводят, так как они нечувствительны к данному грибку. Имеются единичные сообщения об экспериментальном воспроизведении заболевания у лошади в виде местного процесса, у лабораторных животных при внутрибрюшинном заражении криптококком отмечалось поражение регионарных лимфатических узлов.

У возбудителя хорошо выражен плеоморфизм, то есть м о р ф о л о г и я его в культуре и в патологическом материале (от больного животного) различна. Наиболее характерная форма его в организме (исследуемом материале) — яйцевидная, эллипсоидная, форма дрожжевой клетки с хорошо выраженной двуконтурной оболочкой. Длина клетки 3—5 мкм, ширина — 2—3 мкм (рис. 100).

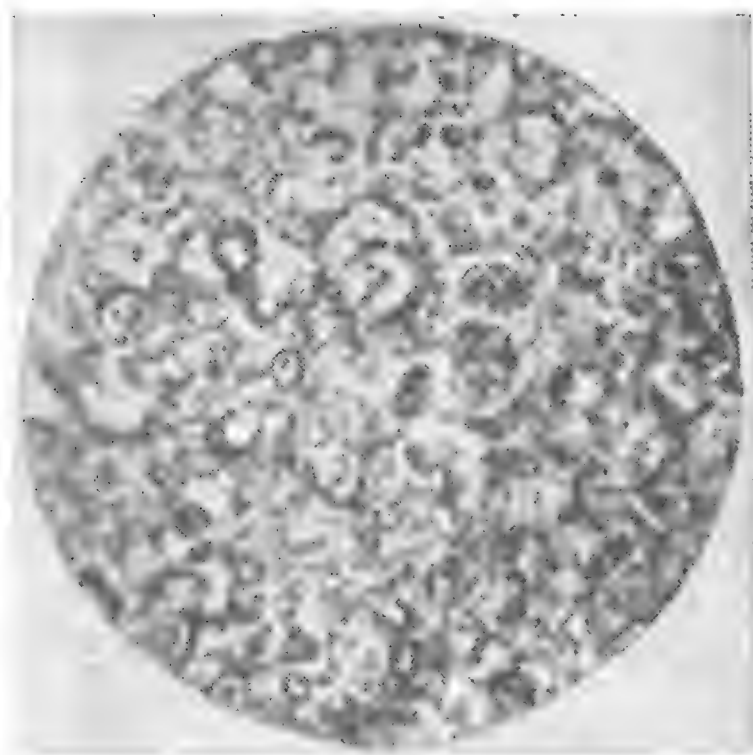


Рис. 100. Криптококк в гное.

Чаще микроскопируют нативный неокрашенный материал — влажный препарат из гноя, прикрытый покровным стеклом, как придавленная капля. Естественный цвет цитоплазмы светло-сине-зеленый, напоминающий цвет морской воды. Внутри клетки просматривают 3—4 гранулы, зернышки. Особенно они хорошо видны в препаратах, окрашенных по Граму или по Романовскому — Гимза. В мазках из культуры формы дрожжевых клеток не встречаются, вне животного организма гриб развивается в мицелиальной форме. Мицелий септированный, ветвящийся, многоклеточный.

Получение первичной культуры криптококка из патологического материала очень трудно. Но если удастся ее вырастить (при рН 6,8—7,0), то при дальнейших пересевах сравнительно легко удастся поддерживать культуры на МППА, глюкозно-глицериновом МПА (углеводов по 2—2,5%). Можно использовать агар Сабуро. Рост колоний проявляется через 10—12 дней. Сначала они мелкие, в последующем увеличивающиеся и возвышающиеся над поверхностью среды. Колонии складчатые, кремового цвета, сухие. Окраска постепенно темнеет, становится коричневой. Для аллергической диагностики лимфангита можно использовать гистоплазмин (Королевой) — фильтрат 3—4-месячной культуры криптококка. При сомнительном результате лабораторного исследования применяют дифференциальную диагностику лимфангита и сапа, используя глазную пробу с маллеином и подкожную пробу с гистоплазмином. Проводят также серологическое исследование — РСК с сапным антигеном.

Классификация криптококка неясна: одни исследователи причисляют его к бластомицетам, другие, на основании некоторых биологических данных, — к несовершенным грибам.

Вопросы для самопроверки. 1. Характеристика возбудителя эпизотического лимфангита. 2. Патологический материал, отбор, пересылка и микологическое исследование с целью диагностики лимфангита. 3. Особенности строения криптококка в организме (патматериале) и вне его (в культуре). 4. Критерии для дифференциации лимфангита от сапа.

Возбудители микотоксикозов

Микотоксикозы (кормовые отравления) — заболевания, вызываемые грибами, продуцирующими токсины. Основные возбудители грибы: *Stachybotrys alternans*, впервые описанный Бонорденом (1853), *Dendrochium toxicum* (Пидопличко с сотр., 1939), *Fusarium sporotrichioides* (Саркисов с сотр., 1944), *Claviceps paspali* (Стевенс и др., 1910), *Aspergillus flavus* (Сержант с сотр., 1961), *Aspergillus fumigatus* (Фрезениус, 1853), *Penicillium rubrum*, *Claviceps purpure* (Тулазне, 1853), *Myrothecium vericaria* (Вертинский с сотр., 1954). Некоторые виды грибов, вызывающие микотоксикозы, могут быть причиной микозов, как, например, *Asp. fumigatus*. К микотоксикозам наиболее восприимчивы лошади, свиньи, овцы, домашняя птица. Менее восприимчив крупный рогатый скот. Микотоксикозами болеет и человек. Основным источником возникновения заболевания — корма, пораженные любым из названных выше видов грибов. Путь инфицирования — алиментарный.

М а т е р и а л о м для микологического исследования служат пробы корма (из складских помещений, остатки корма из кормушек, содержимое желудочно-кишечного тракта). В зависимости от вида корма, отбор проб производят ветеринарные работники, зооинженеры и представители администрации в соответствии с имеющимися ГОСТами. Общее количество корма для диагностического исследования — 0,5—1,0 кг. Пробу корма помещают в стеклянную посуду с притертой пробкой или в мешочки, бумажные пакеты. При отборе проб учитывают локальное расположение отдельных видов грибов в пораженном корме. При диагностике микотоксикозов предварительно исключают инфекционные заболевания животных бактериальной и вирусной этиологии, протекающие с аналогичной клинической картиной, наличие в кормах ядо-

витых растений и их семян, а также ядохимикатов (удобрения, пестициды).

Общая схема исследования при диагностике микотоксикозов включает предварительное органолептическое исследование, микроскопию, выделение чистой культуры и биопробу. Для микроскопирования в каплю дистиллированной воды или физраствора на предметном стекле вносят соскоб видимых поражений с поверхности корма (налет), покрывают покровным стеклом, просматривают при средней степени увеличения без иммерсии. При сильном поражении корма грибом пробу измельчают, помещают в колбочку, заливают физиологическим раствором и взбалтывают в течение 20 минут. Каплю данной взвеси наносят на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют.

Токсичность пробы определяют при скармливании корма или вытяжки из него лабораторным животным. Биопробу можно проводить и на куриных эмбрионах. В ветеринарных лабораториях часто применяют кожную пробу — РКТ (реакция кожной токсичности) на кроликах. Для этого измельченную навеску пробы корма в 50 г помещают в патрон из фильтровальной бумаги и экстрагируют в аппарате Соксклета в течение 6 ч серным эфиром (или ацетоном, хлороформом). Экстрагировать можно и в стеклянной банке с притертой пробкой в течение 24 ч. Экстракт сливают, выпаривают в вытяжном шкафу на водяной бане при 45—50°. На свежесбранный участок кожи (4—5 см²) кролика наносят и втирают полученный экстракт. Через сутки (если какие-либо изменения отсутствуют) втирание повторяют. В положительных случаях через 1—3 дня развивается гиперемия, отечность, вплоть до некроза. Отсутствие реакции на месте введения в течение трех дней свидетельствует о нетоксичности корма (гриба). При постановке данной пробы следует исключить кислотность корма.

При некоторых микотоксикозах разработана реакция иммунофлюоресценции с целью идентификации возбудителя.

Для выделения чистой культуры (с учетом вида корма и предполагаемого вида гриба) смыв с поверхности пораженного корма засевают на агар Сабуро, среду Чапека или на фильтровальную бумагу, пропитанную средой Ван — Итерсона в чашках Петри. Кроме того, можно произвести посев непосредственным внесением пораженного зерна, соломинок на плотные питательные среды.

При определении глубинной пораженности корма грубый корм измельчают и обрабатывают формалином в разведении 1 : 300 в течение 1 ч или денатурированным спиртом 6 мин, промывают 2—3 раза водой и вносят на питательную среду. Культивируют при 22—25°, проверяя рост через 3, 5, 7 и 10 дней. С появлением роста колоний культуру микроскопируют, пересевают споры или мицелий, проверяют токсичность, используя для биопробы по 3—5 белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов, цыплят, утят, гусят, голубей, щенков, кошек. Для определения токсичности корма допускается использовать также цыплят в возрасте 2—3 мес., молодых мышат, морских свинок, поросят в возрасте до 10 дней. В зависимости от степени токсичности гриба, дозы и способа введения животным клиническая и патологоанатомическая картина заболевания проявляются неодинаково.

Определение афлатоксинов в корме, продуцируемых токсигенными грибами родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Rhizopus*, производят на тонкослойных хроматографических пластинках по флюоресценции экстрактов в ультрафиолетовом свете (чувствительность 0,5 мкг в пробе корма 20 г).

При оценке корма, пораженного тем или иным токсигенным грибом, следует пользоваться специальными инструкциями и методическими указаниями, утвержденными Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.

Возбудитель стахиботриотоксикоза — *Stachybotrys alternans* вызывает заболевание (при скармливании пораженного корма) у лошадей, реже у крупного рогатого скота и свиней. К токсину гриба чувствителен и человек. Токсин в химическом отношении является стероидом. Клиническое проявление стахиботриотоксикоза у лошадей характеризуется поражением слизистой ротовой полости и последующих отделов пищеварительного тракта, слюнотечением, образованием язвенных поражений на слизистой. Возможны синдромы возбуждения или депрессии с летальным исходом. У крупного рогатого скота заболевание проявляется обильным слюнотечением, нарушением функции пищеварительного тракта.

Возбудитель стахиботриотоксикоза энергичный разрушитель целлюлозы, поэтому он хорошо растет на поверхности сена, соломы, образуя черный сажистый налет. Пораженный корм направляют в лабораторию.

М о р ф о л о г и я. У гриба септированный многокле-

точный мицелий, на концах конидиеносцев заметны стеригмы (нечетное количество — 5—7), сформированные конидиеспоры, имеющие естественную коричневую окраску. Большое скопление конидий создает черный цвет (рис. 101).

Для выделения чистой культуры производят посев пораженной пробы корма на среду Сабуро, среду Ван — Итерсона или обычный МПБ. Рост проявляется через 5—7 суток при 24—26°.

Токсичность чистой культуры проверяют методом кожной пробы на кроликах или скармливанием культуры (выращенной на стерилизованном овсе) белым мышам, морским свинкам, кроликам, птице. Заболевание может быть воспроизведено у лошадей, свиней, овец при скармливании им инфицированного корма или культуры.

Возбудитель дендродохиотоксикоза — *Dendrodochium toxicum*, вызывает нарушение функции центральной нервной системы у лошадей. Характеризуется молниеносным течением, летальным исходом. Заболевание возникает вследствие поедания соломы или зерна, пораженного грибом, причем органолептически такой корм внешне выглядит доброкачественным.

D. toxicum имеет разветвленные септированные нити мицелия, конидии эллипсоидной формы с заостренными концами, темно-зеленого цвета, размером 2—4×6—8 мкм.

Культивирование производят на агаре Чапека. Рост отмечают в виде плотного сплетения гиф мицелия, на котором проявляются зеленые, затем чернеющие спородохии.

Токсичность культур определяют методом кожной пробы на кроликах, а также скармливанием подсвинкам ячменя, специально зараженного грибом. Культурой можно заразить кроликов и морских свинок.

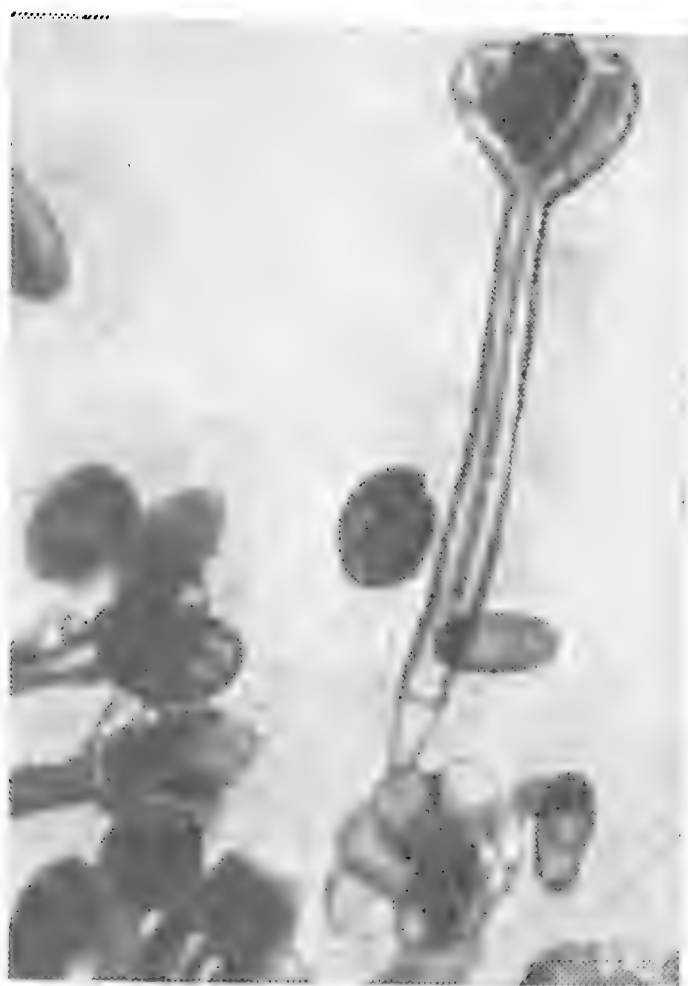


Рис. 101. Конидиеносец *Stachybotrys alternans*, стеригмы и свободные конидии.

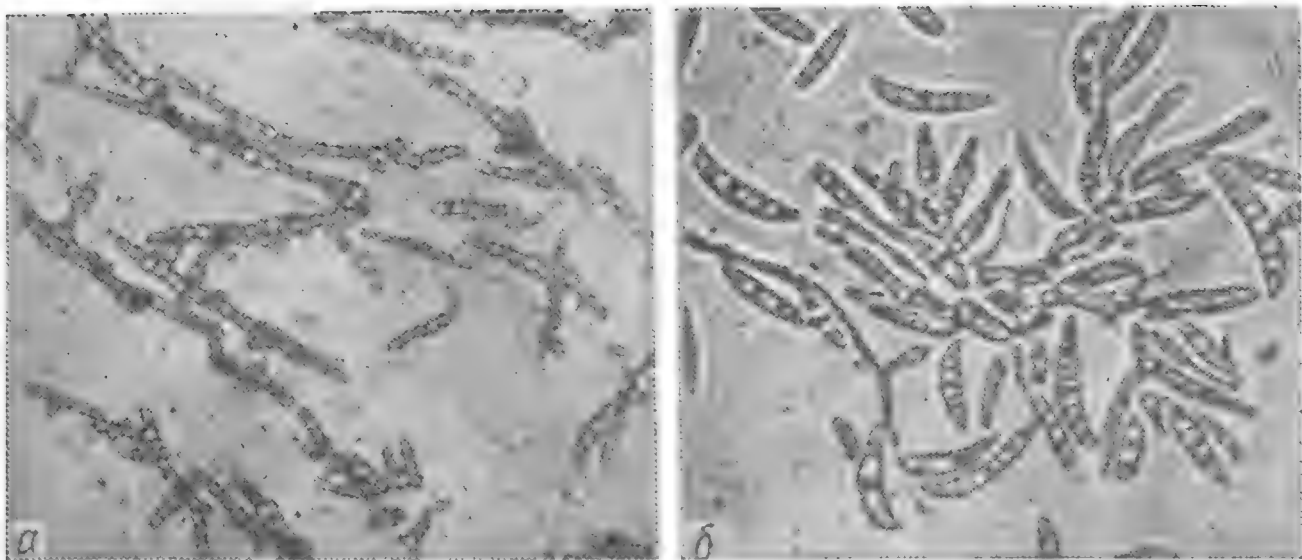


Рис. 102. Фузариум:
хламидоспоры (а) и короткие конидиеносцы спородохия (б.)

Возбудитель фузариотоксикоза. Грибы рода фузариум чаще развиваются на злаковых растениях. При фузариотоксикозе наблюдают дермoneкротические поражения, нарушение сердечной деятельности, лейкопению. Токсин гриба фузариум в химическом отношении является липотоксолом, сапонинпоззарином и их производным. Наиболее часто заболевание животных (включая птиц) вызывают грибы *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. monileforme*.

Зарегистрированы случаи алиментарного фузариотоксикоза у человека. Корм, пораженный фузарием, внешне не всегда заметен.

При микроскопировании в раздавленной капле соскоба выросшей культуры обнаруживают макроконидии и микроконидии гриба. Макроконидии — серповидно-изогнутые с 3—5 перегородками внутри; микроконидии — шаровидной, грушевидной формы, без перегородок или с 1—2 перегородками, возможны хламидоспоры (рис. 102).

Культивируют фузарию на среде Чапека. Неполюценные зерна светло-серого или розового цвета, ллюсят на питательный субстрат. Через 3—5 дней инкубирования при 22—25° проявляется рост пышных желтоватых колоний.

Для получения чистой культуры выросшие колонии пересевают на сусло-агар или картофельный агар. Выросшую культуру микроскопируют. По форме конидий, по величине и количеству в них перегородок, пигментации устанавливают родовую принадлежность гриба.

Для токсинообразования разные виды гриба фузариум нуждаются в различных температурных усло-

виях — от 8° до 26°. Токсичность пробы корма, пораженного фузарием, проверяют на кроликах кожной реакцией (РКТ) или подкожным введением белым мышам. У последних наблюдаются парезы. Исход летальный.

Возбудитель клавицепстоксикоза — *Claviceps paspali*, поражает траву, сено. Развиваясь на поверхности кормов, формирует конидии, округлые желто-бурые склероции, размером 1,5—3,5 мм. Этот гриб вызывает алиментарный токсикоз у лошадей, реже — у крупного рогатого скота, овец, в единичных случаях — у свиней и гусей.

Возбудители аспергиллотоксикозов — *Aspergillus fumigatus*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. clavatus* (всего около 30 видов и разновидностей рода аспергиллус, обладающих токсическими свойствами). Различают 14 токсических фракций токсинов грибов данного рода. Наиболее токсичными являются фракции В₁, В₂, которые обладают канцерогенным действием. Эти токсины названы *афлатоксинами*. Заболевание обычно возникает у птиц, а также у других видов домашних животных вследствие алиментарного инфицирования пораженным кормом. Аспергиллотоксикозом поражается и человек при поедании недоброкачественных как животных продуктов (мясо, молоко), так и растительных (мука, арахис и др.).

Схема микологического исследования проб корма: микроскопирование препаратов из смывов с пораженных участков корма, посевы на специальные питательные среды с целью выделения чистой культуры с последующим ее микроскопированием и определением афлатоксинов.

Морфологические и культуральные свойства возбудителей аспергиллотоксикозов типичны для всех представителей рода *Aspergillus*. Отличия имеет *Asp. flavus*, колонии которого на среде Чапека учитывают через каждые 3—4 дня. Окончательно вид определяют через 10—12 дней культивирования, когда появляются характерные органы плодоношения. Колонии вначале белого, затем зеленоватого или темно-бурого цвета. При микроскопировании отмечают септированный мицелий, гифы 2—3 мкм в диаметре. Конидиеносцы несептированы, на их концах имеются конидиальные головки (булавовидные утолщения) слабо-зеленого цвета, размером до 350 мкм, на концах располагаются продолговатые стеригмы в один ряд. От стеригм отшнуровываются конидии-споры, также зеленого цвета.

Для выделения чистой культуры других видов грибов данного рода производят посев проб корма на другие питательные среды — агар Сабуро, сусло-агар. Исследуют в том же порядке. Токсичность полученных культур грибов определяют подкожным введением белым мышам культуральной жидкости гриба и реакцией кожной токсичности (РКТ). Для установления афлатоксинов применяют методику тонкослойной хроматографии. Помимо грибов рода *Aspergillus*, микотоксикоз может быть обусловлен также грибами рода *Penicillium*, *Mucor* (головчатая плесень) и др. Порядок исследования производится по общепринятой схеме. Культуральные среды стерилизуют текучим паром дробно.

Вопросы для самопроверки. 1. Основные отличия возбудителей микозов и микотоксикозов. 2. Возбудители микотоксикозов, их морфология, культуральные свойства. 3. Материал, взятие, пересылка и схема микологического исследования при микотоксикозах. 4. Общие принципы микологических исследований. 5. Определение токсичности грибов. 6. Основные питательные среды для культивирования грибов при диагностике микозов и микотоксикозов.

СПИСОК НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Для серологической диагностики

Антигены: бруцеллезный, отдельно для РА и РСК; пуллорный для РА; сапной для РСК; лептоспирозный для РМА и РСК; перипневмонийный для РСК; вибрионный для РСК и РА.

Диагностические сыворотки: преципитирующая сибиреязвенная; групповые и монорецепторные салмонеллезные (О- и Н-сыворотки); коли-О-сыворотки; гемолизин для РСК, люминесцирующие (антибруцеллезные, антиперфрингенс); антитоксическая антиботулинус (поливалентная);.

Для аллергической диагностики

Туберкулин (отдельно для птиц и крупного рогатого скота), маллеин, бруцеллизат, бруцеллин, бруцеллогидролизат; тулярин.

Лечебно-диагностические

Антивирус (фильтрат-бульон-вакцина) — мытный, некробактериозный. Бактериофаги — салмонеллезные, коли-фаг, сибиреязвенный гамма-фаг.

Профилактические биопрепараты

Вакцины: против эмкара (формолгидроокисьалюминиевая), против браззота, дизентерии ягнят, энтеротоксемии овец (поливалентная формолгидроокисьалюминиевая); против паратифа поросят (формолгидроокисьалюминиевая), против паратифа телят (формолгидроокисьалюминиевая); против бруцеллеза (живая из штамма № 82, из штамма № 19); против сибирской язвы (вакцины Ценковского — I-ая и II-ая, СТИ — обе вакцины споровые, живые, ГНКИ — живая авирулентная); против рожи свиней (вакцины Конева — I-ая и II-ая, вакцина Глуховцева, ВР₂ — живая ослабленная, против пастереллеза птиц и свиней убитая формолгидроокисьалюминиевая), против лептоспироза (поливалентная феноловая); против столбняка — анатоксин (квасцовый); вакцина против стригущего лишая (ТФ-130).

Лечебно-профилактические сыворотки: против сибирской язвы, рожи свиней, колибактериоза, салмонеллеза (паратифа) поросят и салмонеллеза телят, против лептоспироза, браззота овец, дизентерии ягнят; антитоксическая сыворотка против столбняка, гамма-глобулины крупного рогатого скота.

Предисловие	3
ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	5
Микробиологическая (ветеринарная) лаборатория и ее задачи. Техника безопасности в лаборатории	5
Микроскопы, их устройство и правила работы с ними	9
Морфология бактерий	21
Приготовление препарата для микроскопирования. Методы окрашивания микроорганизмов	22
Определение подвижности микроорганизмов	32
Морфология актиномицетов и грибов	33
Методы стерилизации	37
Культивирование микроорганизмов	44
Питательные среды. Техника посева микробов	48
Методы выделения чистой культуры	55
Методы определения биохимических свойств микробов	58
Бактериофаги и их использование в микробиологической диагностике	63
Определение активности антибиотиков и антибиотикорезистентности микробов	65
Определение патогенности микробов. Заражение и вскрытие лабораторных животных	69
Санитарно-микробиологические исследования почвы, воздуха, воды и молока	72
Методы серологических исследований	81
ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	113
Возбудители отдельных инфекционных болезней (микробиологическая диагностика)	113
Стафилококки	113
Стрептококки	118
Бактерии семейства кишечных	126
Бруцеллы	137
Пастереллы	141
Возбудитель туляремии	143
Возбудитель рожи свиней	146
Возбудитель листериоза	150
Возбудитель сапа	153
Возбудитель мелиоидоза	155
Возбудитель сибирской язвы	157
Патогенные анаэробы	163
Патогенные микобактерии	175
Патогенные актиномицеты	184
Возбудитель вибриоза крупного рогатого скота	186
Возбудитель лептоспироза	190
Микоплазмы	194
Риккетсии	198
Патогенные грибы	200
Возбудители микозов	200
Возбудители микотоксикозов	208
Приложение	215